

**Influência do Local de Produção de Pera ‘Rocha’,  
Armazenada em Atmosfera Controlada, na Incidência a  
Desordens de Escurecimento Interno e na Aptidão para  
Consumo em Fresco e Processado**

**Ana Sofia Lopes Salvador**

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em  
**Engenharia Alimentar - Processamento de Alimentos**

Orientadora: Doutora Marta Maria Moniz Nogueira de Abreu

Orientadora: Professora Doutora Margarida Gomes Moldão Martins

**Júri:**

Presidente: Doutora Fernanda Maria dos Reis Torroaes Valente, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

Vogais: Doutor Miguel António Leão de Sousa, Responsável do Departamento de Fruticultura e I&D na empresa CAMPOTEC;

Doutora Marta Maria Moniz Nogueira de Abreu, Investigadora Auxiliar do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária.

## Agradecimentos

---

Gostaria de agradecer a todos aqueles que de alguma forma tornaram possível a realização deste trabalho:

Agradeço ao Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária IP, pela oportunidade que me concederam na realização deste trabalho, bem como na disponibilização dos meios necessários, nas pessoas do Doutor Pedro Louro, Coordenador da Unidade de Investigação de Ciência e Tecnologia dos Alimentos da Unidade Estratégica de Investigação e Serviços de Tecnologia e Segurança Alimentar e ao Doutor Carlos Santos coordenador do polo do Lumiar.

À empresa CAMPOTEC por ter facultado as matérias-primas necessárias à realização deste trabalho.

Um especial agradecimento à minha orientadora, Doutora Marta Abreu, pelo seu incansável incentivo, pela sua orientação, dedicação e disponibilidade ao longo da realização de todo o trabalho.

À Professora Doutora Margarida Moldão Martins, agradeço a oportunidade dada para a realização deste trabalho, pela sugestão do tema e pela transmissão de conhecimentos.

A todo o pessoal do INIAV pela cooperação e ajuda na realização da componente experimental deste trabalho, em especial à Eng<sup>a</sup>. Cristina Saldanha e à Eng<sup>a</sup>. Manuela Lageiro.

À Catarina e à Diana, agradeço o companheirismo, os almoços e o bom ambiente de trabalho, com vocês os dias passados no laboratório foram sem dúvida mais fáceis.

Quero também agradecer aos meus colegas, que se tornaram grandes amigos, do Instituto Superior de Agronomia, que me acompanharam e apoiaram desde o início do meu percurso académico, obrigado por todo o apoio e amizade, tornaram esta experiência única e enriquecedora.

A todos os meus amigos, de Ponte de Sor e Lisboa, pela amizade, paciência, companheirismo e boa disposição ao longo desta jornada.

A toda a minha família, e aos meus pais em especial a quem devo tudo o que tenho, uma palavra de agradecimento por todo o apoio incondicional, pela confiança em mim depositada e pela liberdade de escolha que sempre me deram, não só durante este percurso académico mas ao longo da vida

*Muito obrigada a todos!*

## Resumo

---

Foram estudadas correlações entre os atributos da qualidade intrínseca de frutos de pera 'Rocha', armazenados nas mesmas condições de atmosfera controlada dinâmica (4 meses), de 3 proveniências geográficas (região oeste) e, a incidência a desordens de escurecimentos internos (EI), com vista a conhecer os fatores que estão na base da suscetibilidade diferenciada. Os frutos demonstraram distinta incidência a EI em função da localização geográfica de produção. Os frutos de Mafra e Lourinhã com 28 e 43% de EI, respetivamente, em contraste com os frutos de Alcobaça (0% de EI). Os parâmetros da qualidade mais distintivos nos frutos de Alcobaça, referem-se à superioridade ( $p < 0,05$ ) nos teores de ácido ascórbico (AA) (4,8 mg / 100g) e de compostos fenólicos totais (CFT) (111,0 mg CAE/ 100 g), com acréscimos de 20 % e 40 %, respetivamente, na comparação com os frutos das restantes origens. Verificou-se que frutos com maior teor em cálcio, menor teor em potássio e maior capacidade antioxidantes são mais resistentes a EI. Por outro lado, quanto mais avançado o estado de maturação pós-colheita e menor o teor de AA, maior a incidência destes sintomas. O envolvimento do AA nos mecanismos de prevenção a EI de pera 'Rocha' não foi claramente evidenciado. No entanto, na zona central da polpa, a constatação de teores de AA sem diferenças significativas entre frutos com e sem manifestação ao EI e, de teores elevados de CFT nos frutos de elevado EI, parece sugerir que a capacidade de resposta dos tecidos ao desequilíbrio redox induzido nas desordens de escurecimento interno é preferencialmente realizado por compostos de natureza fenólica. A capacidade de amadurecimento do fruto, em 4 dias, foi independente da origem dos frutos, no entanto a aptidão para processamento mínimo foi influenciada pela origem geográfica, mostrando os frutos sem EI uma maior capacidade de conservação.

**Palavras-Chave:** Pera 'Rocha'; Pós-Colheita; Desordem de Escurecimento Interno; Atmosfera Controlada; Processamento Mínimo.

## Abstract

---

In this study correlations between Rocha pear quality attributes and the incidence of internal browning (IB) were performed in order to know the major factors which determine different susceptibility of the fruit. Fruits under study were previously stored in dynamic controlled atmosphere (four months) and from three geographical origins (west region). The fruit incidence of IB showed to be dependent on geographical production localization. Fruits from Mafra and Lourinhã with 28 and 43% of IB, respectively, versus Alcobaça, where no symptoms were detected (0% IB). Fruits from Alcobaça showed the highest contents of ascorbic acid (AA) (4,8 mg/100 g) and of total phenolic compounds (CFT) (111,0 mg CAE/100 g), with increases of 20% and 40%, respectively, in comparison to the others, representing these the most distinctive quality factors. It was found that fruits with more calcium content, lesser potassium content and higher antioxidant capacity are more resistant to IB. By other side, the symptoms incidence is bigger in advanced post-harvest ripeness stages and minor AA content. The effects of AA content of the fruit on IB incidence were inconclusive. However, in the fruit core tissues the presence of similar AA contents between fruits, with and without IB, along with significant differences in CFT, could suggest that phenolic compounds are involved as a stress response to internal browning disorders mechanisms. Full ripening capacity was achieved in 4 days (room temperature) regardless fruits origin. However, fruits with higher internal browning incidence showed lesser storage ability (5 °C), as a fresh-cut product.

**Key-words:** ‘Rocha’ Pear; Internal Browning Disorder; Post-Harvest, Controlled atmosphere; Minimal Processing.

## Índice

Agradecimentos .....	ii
Resumo .....	iii
Abstract .....	iv
Índice de Tabelas .....	vi
Índice de Figuras .....	vii
Lista de Abreviaturas .....	ix
<b>Capítulo I - Enquadramento Teórico .....</b>	<b>1</b>
1. Introdução e Objetivos .....	1
2. Revisão Bibliográfica .....	3
2.1 Importância da Pera .....	3
2.2 Pera 'Rocha' – Características, produção agrícola e importância económica .....	3
2.3 Conservação pós-colheita da pera .....	4
2.4 Desordens fisiológicas de escurecimento Interno .....	8
2.5 Sistemas de deteção de desordens de escurecimento interno .....	14
2.6 Hortofrutícolas frescos cortados .....	16
<b>Capítulo II - Desenvolvimento Experimental .....</b>	<b>22</b>
3. Materiais e Métodos .....	22
3.1 Material Vegetal .....	22
3.2 Métodos analíticos .....	22
3.3 Métodos estatísticos .....	27
4. Resultados Experimentais .....	28
4.1 Relação entre parâmetros da qualidade do fruto e a incidência de manifestação a desordens de escurecimento interno .....	28
4.2 Distribuição espacial do ácido ascórbico e dos compostos fenólicos totais na polpa dos frutos .....	42
4.3 Potencial de amadurecimento à temperatura ambiente .....	49
4.4 Aptidão para processamento mínimo .....	55
<b>Capítulo III - Conclusões Gerais .....</b>	<b>61</b>
<b>Referências bibliográficas .....</b>	<b>64</b>
<b>Anexos .....</b>	<b>70</b>

## Índice de Tabelas

---

Tabela 1 - Descrição geral das operações envolvidas no processamento mínimo.....	16
Tabela 2 - Efeitos do processamento mínimo na deterioração da qualidade dos frutos frescos cortados e respectivas causas. ....	18
Tabela 3 - Incidência a EI (%), calibre e valores médios de força máxima ( $\pm$ DP) avaliados nas amostras de pera 'Rocha' (A, B e C).....	32
Tabela 4 - Valores médios ( $\pm$ DP) de pH, TSS, AT e humidade dos frutos avaliados nas amostras de pera 'Rocha' (A, B e C).....	35
Tabela 5 - Valores médios ( $\pm$ DP) do teor mineral dos frutos relativos às amostras A, B e C, expressos em mg por 100g de fruto (PF). ....	36
Tabela 6 - Valores médios de pH e TSS dos frutos, nos dias 0, 4, 6 e 8 de armazenagem. ....	55
Tabela 7 - Valores médios ( $\pm$ DP) de pH e TSS dos frutos minimamente processados, nos dias 0, 2 e 7.....	59

## Índice de Figuras

---

Figura 1 - Frutos de pera 'Rocha' Oeste DOP .....	3
Figura 2 – Desordens de escurecimento interno em peras 'Conference' após 4 meses de armazenagem em condições indutoras de escurecimento. a) Escurecimento radia; b) Escurecimento assimétrico; c) Manchas secas e / ou escuras; d) Cavidades. ....	8
Figura 3 – Registo fotográfico de cavidades de grandes dimensões encontradas em frutos de pera 'Rocha' armazenados em ACD .....	9
Figura 4 – Registos fotográficos representativos de frutos com e sem desordens, respetivamente. ...	22
Figura 5 - Teste de penetração em frutos de pera 'Rocha';.....	26
Figura 6 - Identificação da região geográfica das Quintas produtoras dos frutos de pera 'Rocha' utilizados neste estudo. Adaptado de CODIMACO .....	29
Figura 7 - Diagrama de delineamento experimental e tratamento de resultados do ensaio I. ....	30
Figura 8 - Registos fotográficos das amostras analisadas no ensaio I.....	31
Figura 9 – Valores médios de $h^0$ da polpa dos frutos analisados. Barras verticais correspondem ao intervalo de confiança a 95%. Valores médios com letras diferentes representam diferenças significativas a $p=0,05$ (Teste de Tukey).....	33
Figura 10 – Valores médios de WI referentes Às amostras A, B e C. Barras verticais correspondem ao intervalo de confiança a 95%. Valores médios com letras diferentes representam diferenças significativas a $p=0,05$ (Teste de Tukey).....	34
Figura 11 – Valores médios de AA das amostras A, B e C. Barras verticais correspondem ao intervalo de confiança a 95%. Valores médios com letras diferentes representam diferenças significativas a $p=0,05$ (Teste de Tukey). ....	37
Figura 12 – Valores médios de compostos fenólicos totais (CFT) das amostras A, B e C. Barras verticais correspondem ao intervalo de confiança a 95%. Valores médios com letras diferentes representam diferenças significativas a $p=0,05$ (Teste de Tukey).....	37
Figura 13 - Dendograma das amostras de frutos analisados. ....	39
Figura 14 - Projeção espacial da ordenação dos vetores dos atributos analisados nas amostras (A, B e C) de pera 'Rocha', no plano definido pelas duas primeiras componentes principais. ....	40
Figura 15 – Projeção espacial das amostras (A, B e C) de pera 'Rocha' no plano definido pelas duas primeiras componentes principais.....	40
Figura 16 – Esquema de corte dos frutos, na determinação do teor de AA e CFT em diferentes tecidos. ....	43
Figura 17 - Diagrama de delineamento experimental do ensaio II. ....	44

Figura 18 – Valores médios de AA (mg / 100 g PF) relativos às amostras (A_int; A_ext; B_int; B_ext) de pera ‘Rocha’ com distintas origens geográficas (Alcobaça (A), Mafra (B)), em zonas distintas da polpa (int, ext). Barras verticais correspondem ao intervalo de confiança a 95%. Valores médios com letras diferentes representam diferenças significativas a $p=0,05$ (Teste de Tukey). .....	45
Figura 19 – Valores médios de CFT (mg EAC / 100 g PF) relativos às amostras (A_int; A_ext; B_int; B_ext) de pera ‘Rocha’ com distintas origens geográficas (Alcobaça (A), Mafra (B)), em zonas distintas da polpa (int, ext). Barras verticais correspondem ao intervalo de confiança a 95%. Valores médios com letras diferentes representam diferenças significativas a $p=0,05$ (Teste Tukey). .....	46
Figura 20 – Valores médios de AA (mg / 100 g PF) relativos às amostras do tipo B, em zonas distintas da polpa (int, ext) e a partir de frutos com e sem danos de escurecimento interno visível (Com EI, Sem EI). Barras verticais correspondem ao intervalo de confiança a 95%. Valores médios com letras diferentes representam diferenças significativas a $p=0,05$ (Teste de Tukey). .....	47
Figura 21 – Valores médios de CFT (mg / 100 g PF) relativos às amostras do tipo B, em zonas distintas da polpa (int, ext) e a partir de frutos com e sem danos de escurecimento interno visível (Com EI, Sem EI). Barras verticais correspondem ao intervalo de confiança a 95%. Valores médios com letras diferentes representam diferenças significativas a $p=0,05$ (Teste de Tukey). .....	48
Figura 22 – Diagrama de delineamento experimental para avaliação do potencial de amadurecimento dos frutos à temperatura ambiente. ....	50
Figura 23 – Valores médios de índice de escurecimento (WI) da polpa dos frutos, armazenados à temperatura ambiente, e analisados em 4 momentos distintos (D0, D4, D6 e D8). Barras verticais correspondem ao intervalo de confiança a 95%, .....	51
Figura 24 – Valores médios de tonalidade (hue - $h^{\circ}$ ) do epicarpo dos frutos, nos dias 0, 4, 6 e 8 de armazenagem. Barras verticais correspondem ao intervalo de confiança a 95%, .....	51
Figura 25 - Valores médios de força máxima registada nos dias 0, 4, 6 e 8 de armazenagem. Barras verticais correspondem ao intervalo de confiança a 95%, .....	53
Figura 26 – Valores médios de acidez (g ácido málico/L) dos frutos, dias 0, 4, 6 e 8 de armazenagem. Barras verticais correspondem ao intervalo de confiança a 95%, .....	54
Figura 27 - Diagrama de delineamento experimental e tratamento de resultados. ....	56
Figura 28 – Variação do índice de escurecimento (WI) das amostras de pera ‘Rocha’ minimamente processada (A, B e C), ao longo da armazenagem (7 dias, 5°C). a) Superfície descascada; b) Superfície cortada. Barras verticais correspondem ao intervalo de confiança a 95%. .....	57
Figura 29 – Valores de CFT dos frutos minimamente processados, nos dias 0, 2 e 7. Barras verticais correspondem ao intervalo de confiança a 95%. ....	60



## Lista de Abreviaturas

---

AA – Ácido Ascórbico

AC – Atmosfera Controlada

ACD – Atmosfera Controlada Dinâmica

AT – Acidez Titulável

C – Cromaticidade (Croma)

ca – cerca (circa)

cf.- conforme

CFT - Compostos fenólicos totais

DP – Desvio padrão

DCA – Delayed Controlled atmosphere

h° – Tonalidade (hue)

HFC – Hortofrutícolas Frescos Cortados

Id\_am – Identificação da amostra

PCA – Análise em componentes principais (Principal Components Analysis)

PPO – Polifenoloxidase

TA – Temperatura ambiente

TSS – Teor em Sólidos Solúveis

WI – Índice de escurecimento (Whiteness Index)

PF – Peso fresco

### 1. Introdução e Objetivos

A pera 'Rocha' (*Pyrus communis* L. cv. 'Rocha') é uma variedade Portuguesa com Denominação de Origem Protegida (DOP) de grande, aceitação e importância económica, para a agricultura Portuguesa. Os frutos de pera 'Rocha' apresentam uma elevada capacidade de conservação pós-colheita e, quando armazenados em condições específicas através da combinação de temperatura de refrigeração ( $-0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), humidade relativa elevada (95%) e controlo das pressões parciais dos gases atmosféricos no interior das câmaras:  $\text{O}_2$  (2-3 kPa) e  $\text{CO}_2$  (0,5-0,7 kPa) podem alcançar, períodos até 10 meses (Silva *et al.*, 2010). Nestas condições de atmosfera controlada (AC) verifica-se a diminuição da atividade respiratória e a redução da síntese de etileno, com influência direta na atividade metabólica dos frutos. No entanto, as alterações fisiológicas durante a armazenagem prolongada de pera 'Rocha' em condições de AC não otimizadas poderão ser promotoras de desordens fisiológicas, tais como, os escurecimentos internos e o escaldão superficial, tidas como as principais causas de perdas pós-colheita (Silva *et al.*, 2010).

No que respeita às desordens de escurecimento interno são identificados vários tipos de defeitos designadamente, o 'core brown' e o 'brown heart'. Os sintomas relacionados manifestam-se pelo amolecimento e acastanhamento dos tecidos, com progressão do centro para a periferia da polpa (Lammertyn *et al.*, 2001). Em fases mais avançadas, as lesões podem afetar a totalidade da polpa. No 'brown heart' para além dos sintomas referidos ocorre igualmente a desidratação dos tecidos da polpa com formação de cavidades visíveis, nas zonas lesionadas. Dado que estes defeitos só têm lugar no interior do fruto, sem alteração visível da aparência externa, a respetiva ocorrência acarreta perdas elevadas da qualidade comercial com prejuízos económicos significativos (Silva *et al.*, 2010).

A incidência às desordens de escurecimento interno é diretamente influenciada pela permanência prolongada dos frutos em concentrações gasosas não otimizadas no interior da câmara de atmosfera controlada. Quando os níveis de  $\text{O}_2$  são muito baixos podem ser criadas condições de hipóxia no interior dos frutos causando-lhes 'stress' oxidativo com indução do metabolismo fermentativo. Tem sido igualmente demonstrado que os elevados níveis de  $\text{CO}_2$  são também responsáveis pelo agravamento destas desordens (Deuchande *et al.*, 2015). Nos frutos, as desordens de escurecimento interno relacionam-se diretamente com a verificação de danos ao nível das membranas celulares em consequência da alteração do metabolismo predominantemente aeróbio para anaeróbio.

Em diferentes frutos o teor de ácido ascórbico (AA) foi associado à capacidade de prevenção dos danos oxidativos e, em consequência, à ocorrência de desordens de escurecimento interno. Em peras cv Conference foi caracterizado um limiar de concentração

de ácido ascórbico a partir do qual as mesmas se manifestam (Veltman *et al.*, 1999). Esta vertente de investigação tem sido amplamente desenvolvida e, insere-se na identificação de marcadores químicos que possibilitem assinalar com antecedência a ocorrência destas desordens fisiológicas.

A manutenção da qualidade dos frutos e a sensibilidade que manifestam às alterações fisiológicas durante a armazenagem prolongada em AC são ainda fortemente influenciadas pelas condições edafoclimáticas e, pelas práticas culturais, em que a época de colheita desempenha uma importância particular. A escolha da data correta de colheita dos frutos, é assim essencial para a obtenção de uma boa qualidade para a conservação prolongada dos mesmos. O conhecimento detalhado do comportamento fisiológico e da qualidade intrínseca da matéria-prima, ao nível do cultivar atuam assim como fatores determinantes para a definição das condições de armazenagem e garantir uma apropriada gestão dos frutos e/ou diferenciação de requisitos específicos para processamento.

A prática industrial tem mostrado que nas mesmas condições de AC, a incidência de desordens de escurecimento interno de pera 'Rocha' é dependente da proveniência dos frutos, existindo a sensibilidade que, na região de origem protegida do Oeste, os frutos provenientes da zona da Alcobaça apresentam uma capacidade de conservação superior aos frutos de outras proveniências. Tendo em conta este facto, pretendeu-se conhecer quais os fatores que estão na base da suscetibilidade diferenciada dos frutos, no intuito de conhecer os fenómenos que estão na sua origem e minimizar as perdas pós-colheita.

Na primeira fase deste estudo e com vista a estabelecer parâmetros de qualidade inicial que possam prever um comportamento adequado foram estabelecidas correlações entre diferentes atributos físico-químicos e a percentagem de incidência a desordens internas, caracterizados em frutos de pera 'Rocha' armazenados, em contexto industrial, nas mesmas condições de atmosfera controlada dinâmica (ACD, 4 meses) e com distintas proveniências geográficas (3 quintas na região demarcada do oeste). Tendo em consideração o papel atribuído ao teor de ácido ascórbico na suscetibilidade do fruto às desordens de escurecimento interno, foram, num segundo tópico e, no mesmo tipo de amostras, avaliados o teor de AA e de compostos fenólicos totais em diferentes tecidos da polpa (com e sem manifestação de escurecimentos visíveis). Com o objetivo de avaliar a capacidade de amadurecimento da pera 'Rocha' em condições de simulação da comercialização, efetuou-se, numa terceira fase, a monitorização de atributos da qualidade físico-química (8 dias, 20 °C), de frutos previamente armazenados em condições de ACD e de diferentes origens geográficas. Por fim, com a finalidade de testar a aptidão da pera 'Rocha' para processamento mínimo em função da qualidade inicial da matéria-prima (distintas origens geográficas) foram avaliados atributos da qualidade físico-química nos frutos submetidos a operações de processamento mínimo (descasque, corte em quartos e embalagem em atmosfera modificada passiva) durante 7 dias (5 °C).

## **2. Revisão Bibliográfica**

### **2.1 Importância da Pera**

A pera é um dos frutos de maior aceitação e importância económica internacional. A produção mundial de peras em 2010 foi de 22,64 milhões de toneladas, distribuídas por uma superfície de 1,7 milhões de hectares. A China é o maior produtor, responsável por 67% da produção mundial. O segundo maior produtor mundial, a Itália, foi responsável por apenas 3% da produção mundial, em 2010, e apresentou redução de 23% da sua produção em relação ao ano de 2001. Os Estados Unidos, que apresentam a produção semelhante à Itália, também tiveram sua produção de peras reduzida em 21% nesse mesmo período. Dentre os maiores produtores mundiais, destacam-se como os que apresentaram maior aumento na produção a China, a Índia, a África do Sul e a Argentina (GPP, 2012).

Segundo dados do Instituto Nacional de estatística, em Portugal continental, a pera ocupa a terceira posição na produção de frutos frescos, representando 12,4% do volume total (GPP, 2007).

### **2.2 Pera 'Rocha' – Características, produção agrícola e importância económica**

Os frutos da variedade 'Rocha' caracterizam-se pela coloração amarela e por apresentar formas variáveis, predominantemente redonda ovalada, redonda piriforme ou piriforme ovalada, com peso médio de 180 g. A cultivar apresenta carepa na região de inserção do pedúnculo, que se dispersa, irregularmente, por toda a superfície (Figura 1) (ANP, 1997). A polpa é branca, suculenta, firme e com presença de esclereídeos, responsáveis pela aspereza que confere sensação de grânulos ao paladar (Bain, 1961).



Figura 1 - Frutos de pera 'Rocha' Oeste DOP

A campanha das peras de conservação decorre de Agosto do ano  $n$  até Junho do ano  $n+1$ , graças ao poder de conservação dos frutos em estruturas de frio, convencional e em atmosfera controlada.

Para além das suas características intrínsecas, a pera 'Rocha' apresenta como vantagem face às outras variedades, o facto de ter uma excelente capacidade de conservação,

resistência ao transporte e ao manuseamento, que se traduz na possibilidade de ter uma época de comercialização bastante prolongada, sem quebra de qualidade.

A Pera 'Rocha' do Oeste é a única pera nacional com "Denominação de Origem Protegida" (DOP) sendo a entidade gestora a Associação Nacional de Produtores de Pera 'Rocha' (ANP) e a entidade certificadora a CODIMACO. Segundo esta entidade, o valor das vendas da produção de pera 'Rocha' representa cerca de 90 milhões de Euros por ano.

Portugal produz 230.000 ton. de pera rocha, das quais, cerca de 31%, corresponde a produção certificada, sendo o produto agrícola com maior quota de certificação (GPP, 2012).

A produção nacional de pera assenta na variedade 'Rocha', representando cerca de 97% da produção total. A quase totalidade desta variedade é produzida em Portugal, embora alguns países já possuam pomares da mesma, como a França, a Espanha e o Brasil.

A região do Ribatejo e Oeste destaca-se como a zona produtora de pera 'Rocha' mais importante quer em número de explorações quer em termos de área cultivada. É nos concelhos do Bombarral, Cadaval, Caldas da Rainha e Lourinhã que se encontra uma mancha de pomar correspondente a 64% da área total de pera no Oeste.

Até ao ano de 2004 a quase totalidade da produção de Pera 'Rocha' do Oeste DOP destinou-se ao mercado externo, tanto para a UE, como para países terceiros. A pera com destino a países terceiros é sujeita ao processo de certificação pela CODIMACO, enquanto a com destino à U.E só é certificada se os associados o requererem.

A consolidação de pera 'Rocha' no mercado externo tem um peso económico importante na medida em que tem permitido manter, com vantagem, um saldo positivo na balança comercial. Apesar da tendência do mercado no sentido da estabilidade dos preços de mercado e da existência de pressões para a redução dos preços no produtor, a dinâmica de crescimento sustentado das exportações, sobretudo desde 2003, tem gerado um interesse crescente dos operadores, estimulando as estratégias de valorização da Pera Rocha no mercado externo.

## **2.3 Conservação pós-colheita da pera**

A pera é um fruto climatérico cujo amadurecimento é regulado pelo etileno. Os frutos com este comportamento verificam, logo após o início do processo de maturação, um aumento rápido da intensidade respiratória. Após o pico climatérico as reações relacionadas com o amadurecimento e a senescência sucedem-se de forma acelerada e com elevados gastos de energia. Nestes casos se o fruto amadurecer na planta revela comprometimento da qualidade sensorial, que no caso da pera reflete como principais problemas a manifestação de textura indesejável (farinácea), e a perda de suculência (Agar *et al.*, 1999).

A pera deve por isso ser colhida no estado de maturação fisiológica, geralmente muito firme, isto é, no estado pré-climatérico em que o fruto ainda não apresenta todas as características

desejáveis para ser consumido, devido à excessiva firmeza e ao incompleto desdobramento do amido em açúcares solúveis, ao elevado teor em ácidos orgânicos, bem como à reduzida síntese de compostos voláteis característicos do aroma das peras maduras.

No momento da colheita recomendasse para a pera 'Rocha' valores de firmeza e sólidos solúveis, de 55-65 N firmeza e de 10-11 °Brix, respetivamente (ANP, 1997).

### **2.3.1 Indução e uniformização do amadurecimento por meio de condicionamento ao frio**

A pera para estar apta para o consumo necessita normalmente de exposição a baixa temperatura (-1 °C a 0 °C e 90% HR) condição necessária para se dar início à biossíntese autocatalítica do etileno responsável pelo controlo do processo de amadurecimento (Lelièvre *et al.*, 1997) ou, em alternativa, através da aplicação de etileno exógeno.

O tempo de refrigeração requerido pelos frutos para alcançar o amadurecimento uniforme depende de fatores como cultivar, localização do pomar, estado de maturação dos frutos no momento da colheita, para além, da temperatura utilizada no processo (Sugar; Basile, 2006; Sugar; Einhorn, 2011).

Para a pera 'Rocha', o período de refrigeração recomendado é de aproximadamente 60 dias à temperatura 0°C (Fonseca *et al.*, 2005). Contudo, de acordo com alguns autores, o aumento da temperatura utilizada neste período pode reduzir o tempo de armazenagem necessário à indução do amadurecimento dos frutos (Sugar; Einhorn, 2011), o que pode ser vantajoso por possibilitar aos produtores disponibilizarem os frutos mais cedo no mercado.

No caso da pera 'Rocha' para a indução do amadurecimento do fruto através da aplicação de etileno exógeno (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>) uma concentração de 100 ppm é suficiente, proporcionando o desenvolvimento da textura desejável (amanteigada) e do aroma característico (Fonseca *et al.*, 2005). No entanto, a eficiência da indução do processo de amadurecimento também depende do clima e local de crescimento dos frutos, da cultivar, do ponto de colheita, da temperatura de aplicação e do período de exposição dos frutos ao C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> (Sugar e Basile, 2013).

No fim do período de armazenagem pós-colheita, os frutos são mantidos em ambientes com temperatura a variar de 15 °C a 21 °C e, com 80 a 85% humidade relativa (Cantillano, 1987) de forma a alcançar o estado de maturação comercial requerido no consumo *in natura*.

### **2.3.2 Condicionamento em condições de AC**

O armazenamento em condições de atmosfera controlada (AC) permite manter a qualidade dos frutos por períodos prolongados, em que para além do controlo da temperatura e da humidade relativa, se efetua o controlo das pressões parciais de O<sub>2</sub> e de CO<sub>2</sub> no ambiente das câmaras.

A redução das pressões parciais de  $O_2$  atua diretamente na inibição da cadeia respiratória, nomeadamente nas reações do processo oxidativo. A elevação das pressões parciais de  $CO_2$  diminui igualmente a atividade metabólica dos frutos ao atuar na inibição das reações do ciclo dos ácidos tricarboxílicos e, na diminuição da atividade de diversas enzimas. Em consequência a alteração da composição gasosa nas câmaras durante a armazenagem diminui a atividade respiratória e, a síntese e ação de etileno (Weber *et al.*, 2013).

O grande benefício da AC reside no atraso dos fenómenos envolvidos no amadurecimento e na senescência dos frutos, na dependência da espécie do fruto, do cultivar, do estado de maturação e do comportamento climatérico (tipo de respostas fisiológicas induzidas pelo etileno). Em termos genéricos, para que haja benefício da AC, o nível de  $O_2$  deve ser reduzido para a gama de 1-3% e o nível de  $CO_2$ , para a gama de 3-15%, dependendo do produto (Brackmann e Chitarra, 1998).

Nos frutos, a continuidade dos processos metabólicos no período pós-colheita induz alterações químicas nos mesmos entre as quais a hidrólise do amido é uma reação importante que caracteriza o comportamento climactério. O aumento da atividade respiratória e da produção de etileno durante o amadurecimento pós-colheita promovem outras reações complexas, das quais se destacam: o aumento da concentração de açúcares, a solubilização de substâncias pécnicas, a degradação da clorofila, o aumento das concentrações de ácidos orgânicos, a produção de compostos voláteis, o teor em vitaminas, sais minerais e a alteração da permeabilidade dos tecidos vegetais.

As exigências de AC são específicas para cada fruto e cultivar e podem variar em função das características de cada região produtora. Cada fruto reage de forma diferente perante os níveis gasosos estabelecidos, existindo limites de tolerância específicos: níveis máximos de  $CO_2$  e mínimos de  $O_2$ , a partir dos quais se desencadeiam alterações fisiológicas indesejáveis e em que se manifestam em lesões irreversíveis nos frutos. De facto a permanência prolongada em condições de AC pode, por outro lado, ser promotora de distúrbios fisiológicos com impacto negativo na qualidade dos frutos (Richardson *et al.*, 1997). Em termos gerais, quanto mais elevados forem os níveis de  $CO_2$  e maiores os períodos de armazenagem maior será a incidência a determinados tipos de acidentes fisiológicos (Pintó *et al.*, 2001).

Em AC a capacidade de armazenagem de peras 'Packham's Triumph' pode alcançar de 7 a 8 meses a  $-0,5^\circ C$ , com níveis de  $O_2$ , de 1-3 kPa e, de  $CO_2$ , de 0,5-2,5 kPa (Richardson; Kupferman, 1997). Já no caso da pera 'Conference', frutos armazenados a  $-0,5^\circ C$  podem manter qualidade até 6 meses em condição de AC de 2 kPa de  $O_2$  e 1 kPa de  $CO_2$  em comparação com apenas 3 meses em condições de refrigeração (Chiriboga *et al.*, 2011). Peras 'Bartlett', armazenadas em AC nas condições de 1 a 1,5 kPa de  $O_2$ , podem apresentar retardamento no processo de amadurecimento e na incidência de desordens fisiológicas internas, assim como, período de armazenagem prolongado.

O aumento do CO<sub>2</sub> para pressões parciais acima de 1 kPa na atmosfera envolvente pode aumentar a incidência de escurecimento da polpa em frutos suscetíveis à ocorrência da desordem (Ekman *et al.*, 2004). Galvis-Sánchez e Morais (2001) verificaram que a pera 'Rocha' proveniente da região Oeste de Portugal, armazenadas nas condições AC: 2 kPa de O<sub>2</sub> e 1,5 kPa de CO<sub>2</sub>, a uma temperatura de 0 °C, mantiveram a qualidade desejável durante nove meses sem verificação de incidência a escurecimentos na polpa, apresentando capacidade para alcançar a maturação comercial, após manutenção dos frutos à temperatura ambiente.

Apesar dos benefícios da atmosfera controlada (AC) a armazenagem nestas condições pode favorecer a ocorrência de escurecimento de polpa nos frutos (Galvis-Sanches *et al.*, 2004), levando a consideráveis perdas económicas.

Uma medida altamente recomendada é a aplicação de frio imediatamente após a colheita (DCA – delayed CA), de forma a reduzir a atividade respiratória o mais cedo possível, pelo menos três semanas até aplicar as condições de AC e diminuindo a incidência a EI, mesmo para frutos de colheita tardia (Roelofs and de Jager, 1997; Verlinden *et al.*, 2002).

### **2.3.3 Perda da qualidade comercial**

Quando os frutos são armazenados por períodos prolongados, os mesmos, podem manifestar padrões de amadurecimento anormais, no que se refere à perda da capacidade de amadurecimento, tornando-os demasiado firmes, secos e incapazes de atingir textura desejada. Este é um problema comum em peras, sendo uma das possíveis causas o consumo das reservas por meio da respiração (Murayama *et al.*, 2002).

A armazenagem em condições de AC não otimizadas pode dar origem a uma série de desordens nos frutos, que incluem a perda da capacidade de desenvolver textura amanteigada, perda de qualidade sensorial e também a incidência de desordens internas na polpa, nomeadamente a manifestação de escurecimentos internos na polpa (Drake *et al.*, 2001; Saquet; Streif, 2006; Franck *et al.*, 2007). O escurecimento de polpa é caracterizado pela presença de manchas escurecidas e pela formação de cavidade no interior da polpa de peras (Lammertyn *et al.*, 2003; Franck *et al.*, 2007). Esta desordem fisiológica interna está normalmente associada à permanência dos frutos em ambientes com pressões parciais de CO<sub>2</sub> elevadas ou pressões parciais de O<sub>2</sub> baixas.

De fato, em situações comerciais assiste-se por vezes a um rápido amadurecimento da pera, normalmente associado a condições de conservação inadequadas tais como a utilização de equipamentos de refrigeração subdimensionados, a existência de poucas câmaras de atmosfera controlada, e/ou condições de AC inadequadas, estivas incorretas e a quebra da cadeia de frio durante a distribuição das peras (Isidoro e Almeida, 2005).



O desenvolvimento de doenças de pós-colheita nos frutos durante a armazenagem pode ser igualmente responsável pela redução drástica do respectivo período de armazenagem, envolvendo prejuízos elevados e reduzindo as mais-valias na cadeia de conservação, armazenamento e distribuição (Silva *et al.*, 2000). Os agentes patogénicos reconhecidos como causa das doenças com maior incidência em pomóideas são *Penicillium expansum* e *Botrytis cinera*, responsáveis pela podridão azul e cinzenta, respetivamente. As perturbações durante a armazenagem pós-colheita, provocadas por agentes bióticos e abióticos implicam assim significativas perdas na fileira frutícola, representando um dos principais obstáculos à respetiva comercialização e consumo.

O foco deste trabalho reporta à perda de qualidade comercial do fruto relacionada com as desordens fisiológicas que se expressam pelo desenvolvimento de escurecimentos internos da polpa

## 2.4 Desordens fisiológicas de escurecimento Interno

### 2.4.1 Definição e sintomas

De acordo com Franck *et al.* (2007), o termo desordem fisiológica utiliza-se de forma genérica para descrever sintomas de escurecimento interno da polpa, uma vez que a manifestação dos sintomas associados é muito diversificada. Assim os frutos danificados podem apresentar: escurecimento radial (Fig. 2a), escurecimento assimétrico (Fig. 2b), manchas secas e / ou escuras (Fig. 2c) e cavidades (Fig. 2d).

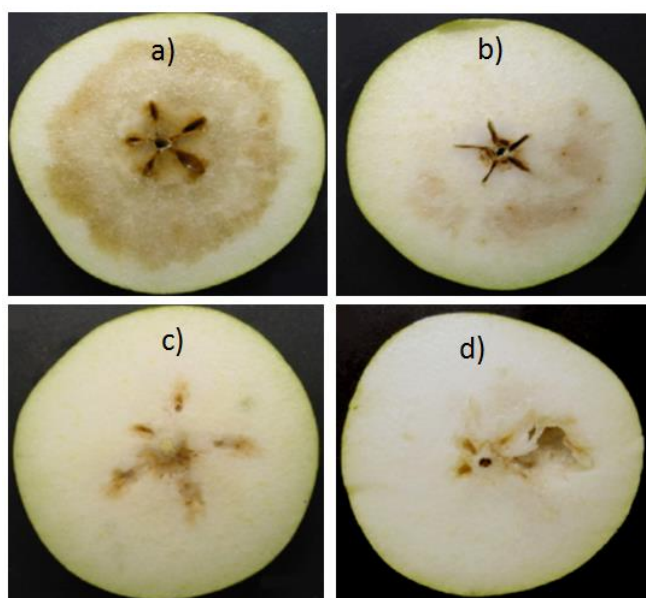


Figura 2 – Desordens de escurecimento interno em peras ‘Conference’ após 4 meses de armazenagem em condições indutoras de escurecimento. a) Escurecimento radia; b) Escurecimento assimétrico; c) Manchas secas e / ou escuras; d) Cavidades. Adaptado de Franck *et al.* (2007).

Outro sintoma característico é a formação de cavidades no interior da polpa, as quais podem ocorrer isoladamente ou mesmo simultaneamente a par das manchas escurecidas (Lammertyn *et al.*, 2003). As cavidades podem também apresentar diferentes padrões: pequenos pontos escuros com padrão de distribuição em estrela, correspondente aos cinco carpelos, zonas cujas lesões estão distribuídas aleatoriamente ou cavidades distribuídas aleatoriamente e geralmente de maior dimensão (Fig. 3.).



Figura 3 – Registo fotográfico de cavidades de grandes dimensões encontradas em frutos de pera ‘Rocha’ armazenados em ACD

Em termos gerais, o escurecimento surge na cavidade central onde estão alojadas as sementes, evoluindo para o exterior até atingir a totalidade da polpa, que adquire posteriormente a cor castanha. Os sintomas podem ser divididos em três grupos: (i) escurecimento da polpa, (ii) cavidades (iii) escurecimento e cavidades.

Fu *et al.* (2007), em peras William's identificaram dois tipos de desordens de escurecimento, designados por ‘brown heart’ e ‘core breakdown’. O ‘brown heart’ como sendo o escurecimento que tem início na cavidade central e se estende radialmente para a polpa, em oposição ao ‘core breakdown’ que surge na polpa e se desenvolve para a cavidade central. No entanto após o agravamento dos sintomas torna-se difícil identificar qual o em causa.

Giraud *et al.* (2001) também adotaram a distinção entre o ‘brown heart’ e o ‘core breakdown’, resultando o último do processo de senescência do fruto.

Larrigaudière (2004) identificaram um comportamento metabólico diferente entre os dois distúrbios fisiológicos. Segundo estes autores, o ‘brown heart’ decorre do processo de senescência tendo apenas o armazenamento em ambientes de CO<sub>2</sub> elevado o efeito de agravar a expressão dos sintomas. A associação do ‘core breakdown’ a este processo ficou por esclarecer uma vez que frutos naquelas condições apenas desenvolveram sintomas quando armazenados em concentrações elevadas de CO<sub>2</sub>. Os sintomas de ‘core

breakdown' estão associados a danos oxidativos (Larrigaudière *et al.*, 2001a; Lentheric *et al.*, 2003),

Roelofs e De Jager (1997) sugeriram que o desenvolvimento de cavidades faz-se a partir dos tecidos lesionados castanhos tendo em conta que a evolução do escurecimento ao longo do tempo antecede ao aparecimento das cavidades. Este fato foi confirmado através de técnicas de imagem por ressonância magnética, em peras armazenadas em condições favoráveis ao aparecimento dos sintomas (Lammertyn *et al.*, 2003). Os autores descobriram ainda que a manifestação de escurecimento não apresenta um padrão de desenvolvimento radial ao longo do tempo, mas que o mesmo se agrava com o decorrer do armazenamento.

Mesmo quando o escurecimento interno afeta a totalidade da polpa, o fruto mantém a aparência e estrutura externa, intactas, dificultando a respetiva deteção antes da sua abertura. Apesar do aspeto exterior do fruto permanecer inalterado, o sabor e o aroma são fortemente afetados (Franck *et al.*, 2007) podendo a ocorrência destes acidentes fisiológicos ser a causa de inesperadas e importantes perdas económicas.

A classificação dos sintomas deste distúrbio fisiológico continua a ser muito subjetiva e neste trabalho será adotada a denominação de 'desordem de escurecimento interno' (EI) embora haja indícios de que na sua origem possam estar envolvidos diferentes mecanismos.

#### **2.4.2 Fatores pré-colheita**

São poucas as desordens pós-colheita que são completamente independentes de fatores pré-colheita (Ferguson *et al.*, 1999).

Os fatores pré-colheita podem ser agrupados em três conjuntos:

- Características sazonais (temperatura durante a produção, períodos de chuva);
- Características do pomar (Caraterísticas do solo e das árvores, aplicação de agroquímicos e a nutrição mineral, irrigação e a localização geográfica);
- Posição dos frutos na árvore (Franck *et al.*, 2007).

A combinação de fatores pré-colheita específicos resulta num conjunto particular de atributos intrínsecos da pera à colheita que determina se a pera é mais suscetível a desordens ou não. Assim, a avaliação do efeito de cada fator individualmente não é suficiente, devem ser sim analisadas as interações entre eles. Os principais atributos da pera afetados pelos fatores pré-colheita, e com influência conhecida na suscetibilidade ao escurecimento interno, são o tamanho dos frutos, o teor de AA e CFT e as propriedades de transporte de gases (Lentheric *et al.*, 1999; Hamauzu and HanaKawa, 2003)

Também o tipo de variedade parece ter alguma influência na incidência a desordens fisiológicas internas, algumas variedades de pera apresentam maior suscetibilidade à

ocorrência das desordens fisiológicas, na qual se inclui a pera 'William's' (Yazdani *et al.*, 2011). A pera 'Rocha' apresenta capacidade antioxidante superior às demais cultivares de importância comercial, o que pode contribuir para a sua excelente capacidade de armazenamento e menor suscetibilidade ao escurecimento da polpa (Salta *et al.*, 2010)

Para Franck *et al.* (2007) os principais fatores que causam desordens de escurecimentos internos na pós-colheita são as condições de armazenagem em refrigeração (temperatura e duração) e o estado de maturação no momento da colheita. Em geral, frutos colhidos tardiamente são mais suscetíveis às desordens de EI, em resultado da menor resistência da polpa à difusão gasosa.

Crisosto *et al.* (1994) realizaram duas colheitas com intervalo de sete dias, onde os frutos da primeira colheita, ou seja, colhidos precocemente não apresentaram desordens fisiológicas após serem armazenados por 28 dias a 0 °C e armazenados em câmara durante 7 dias à temperatura de 20 °C. Em contrapartida, 100% dos frutos da segunda colheita apresentaram desordens fisiológicas quando armazenados nas mesmas condições.

#### **2.4.3 Relações entre o EI e as condições de AC**

O controlo das pressões parciais de O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> no interior da câmara (altas pressões de CO<sub>2</sub> baixas pressões de O<sub>2</sub> proporciona frutos com qualidade após longos períodos de armazenamento, porém, o armazenamento sob condições impróprias pode ocasionar a incidência de distúrbios fisiológicos (Drake *et al.*, 2001; Franck *et al.*, 2007)

Os principais fatores que afetam a incidência e severidade a desordens de escurecimento interno durante o armazenamento por longos períodos de tempo são: o estado de maturação dos frutos à colheita, o balanço entre os processos de oxidação e redução, o metabolismo fermentativo, as pressões parciais de gases usadas no armazenamento em AC e a temperatura (Veltman *et al.*, 1999;2000;Larrigaudière *et al.*, 2001)

Condições inadequadas de AC, tais como níveis de CO<sub>2</sub> muito elevados no interior da câmara, podem conduzir a uma maior acumulação deste gás na polpa, agravando em consequência a extensão dos danos (Pedreschi *et al.*, 2008). Por outro lado, os sintomas podem resultar igualmente da redução nas pressões parciais de O<sub>2</sub> no ambiente da câmara de AC, induzindo níveis extremamente baixos desse gás nas células do interior da polpa (Franck *et al.*, 2007). As desordens de escurecimento interno do fruto, provocadas pela acumulação de CO<sub>2</sub>, podem ser atribuídas à dificuldade de difusão deste gás através dos tecidos da polpa, em que as pressões parciais no interior são superiores face às verificadas nas camadas mais próximas da casca (Ho *et al.*, 2006; Pedreschi *et al.*, 2008).

Os ambientes gasosos anteriormente caracterizados configuram condições de 'stress' oxidativo promotoras de alteração no normal metabolismo celular para condições respiração anaeróbica no interior da polpa. Em consequência aumenta o conteúdo de etanol, de

acetaldeído e de outros produtos tóxicos à célula, levando a formação de radicais livres, com efeitos na alteração do metabolismo energético e danos nas membranas celulares da polpa (Saquet *et al.*, 2003; Saquet; Streif 2006; Franck *et al.*, 2007; Neuwald *et al.*, 2008).

A ocorrência de desordens de escurecimento interno pode assim ser atribuída à desestruturação das membranas, ocasionada por meio da combinação da ação dos radicais livres e falta de energia de manutenção que seria atribuída aos antioxidantes (Veltman *et al.* 1999; 2000).

A perda da integridade celular conduz à descompartimentalização celular facilitando-se a contato da enzima polifenoxidase (PPO) com os respectivos substratos fenólicos. A subsequente oxidação enzimática origina a formação de o-quinonas, compostos muito reativos que ao polimerizarem dão origem posteriormente a polímeros de cor castanha (Yan *et al.*, 2013).

#### **2.4.4 Relações entre o EI e o teor em ácido ascórbico**

Segundo Pinto *et al.* (2001), a relação entre o EI e o teor de AA nos frutos assenta no fato das condições de armazenagem em atmosfera controlada serem promotoras de alterações na capacidade redox dos tecidos e de danos causados na função mitocondrial. A acumulação de compostos redutores (ex. NADPH) tem como consequência a produção de espécies reativas de oxigénio (designadas por ROS). A atividade de enzimas antioxidantes, tais como, a superóxido dismutase (SOD), a ascorbato peroxidase (APX) e a glutathione redutase (GSR) pode aumentar, em condições de AC e, em consequência aumentar o consumo de ácido ascórbico.

O desequilíbrio entre o consumo e a regeneração de AA e o aumento da remoção não enzimática de radicais livres pelo AA tem como resultado uma diminuição da respetiva concentração. Para além disso, a insuficiência em AA é responsável pela inativação da enzima ascorbato peroxidase (APX) (Asada, 1992), inviabilizando-se desta forma a prevenção de danos oxidativos e tendo como resultado a peroxidação das membranas lipídicas e consequente descompartimentalização celular. Esta situação viabiliza assim o contato entre a enzima polifenoloxidase (PPO) e os respectivos substratos fenólicos, dando origem ao escurecimento dos tecidos.

A hipótese desenvolvida por Veltman *et al.* (1999) e Zerbini *et al.* (2002) refere que quanto maior for a concentração de AA menor é a suscetibilidade da pera face a este distúrbio fisiológico e, que o mesmo tem lugar durante a armazenagem quando a diminuição do teor em AA ultrapassa uma determinada concentração – hipótese do limiar de concentração de AA.

Neste âmbito são referidos na literatura uma diversidade de valores limiar para o AA, não existindo, no entanto, correspondência entre a incidência de EI e as concentrações de ácido ascórbico que têm sido propostas.

Veltman *et al.* (1999) determinou uma concentração de AA de 1,3 mg / 100 g PF, nos tecidos da polpa como valor limiar a partir do qual a incidência de EI excede 0,35. Zerbini *et al.* (2002) determinou um teor de AA de 0,2 mg /100 g PF como limiar de concentração crítico através da análise dos tecidos internos de peras saudáveis. Neste último estudo o valor limiar foi definido como o valor de concentração a partir do qual se manifesta a primeira evidência de escurecimento e corresponde aparentemente a 5% da concentração de AA no momento da colheita.

Quando a Pera 'Rocha' é armazenada em condições de refrigeração antes de ser transferida para condições de CA em vez de ser transferida diretamente para CA (*delayed* CA - DCA), a capacidade de retenção dos níveis de AA no fruto é superior, revelando-se este método eficaz na prevenção da incidência de EI em peras (Veltman *et al.*, 1999, Veltman *et al.*, 2000). Zerbini *et al.* (2002) confirmou estas conclusões num estudo realizado em peras italianas da variedade Conference. Neste estudo foi igualmente verificada a tendência de diminuição do AA durante a armazenagem, segundo um modelo exponencial, tendo-se constatado o aparecimento de EI quando a concentração de AA foi inferior a um determinado limiar correspondente a 5% do conteúdo caracterizado após a colheita.

O estado de maturação dos frutos tardio na colheita e a armazenagem dos mesmos em níveis de CO<sub>2</sub> elevados determinam o aparecimento de EI e conduzem ao aumento da taxa de perda de AA, possivelmente atribuído à redução da capacidade antioxidante (Zerbini *et al.*, 2002).

No estudo desenvolvido por Franck *et al.* (2003) em pera (cv Conference) foram investigadas as variações da concentração de AA durante a armazenagem em AC e a respetiva distribuição espacial através dos tecidos da polpa. Os autores verificaram que a taxa de diminuição de ácido ascórbico foi muito maior (ca de 4 vezes) em condições de AC não otimizadas face a condições de AC otimizadas.

O mapeamento das concentrações de AA através dos tecidos do fruto (técnicas de imagem) evidenciou uma distribuição acentuadamente assimétrica. Neste sentido os autores alertam para o fato da amostragem dos tecidos ser absolutamente crucial neste tipo de estudos podendo cortes aleatórios conduzir a resultados enganosos. Franck *et al.* (2003)

Segundo estes autores, mais importante do que propor um valor limiar de AA (determinado neste caso para a concentração de 0.37 mg / 100 g), foram os resultados evidenciados através do mapeamento que permitiram confirmar a elevada capacidade de prevenção oxidativa do AA neste tipo de lesões, evidenciada pela observação de tecidos saudáveis (brancos) no interior dos tecidos lesionados (escuros) onde a concentração de AA é

pontualmente elevada. A importância do ácido ascórbico relativamente à incidência de EI não deve ser sobrevalorizada, uma vez não ser este o único composto com efeitos antioxidantes elevados.

#### **2.4.5 Relações entre o EI e a composição mineral**

A sensibilidade dos frutos às condições de CO<sub>2</sub> ou e de O<sub>2</sub> está ainda na dependência de diversos fatores pré-colheita, tal como a nutrição mineral dos frutos. Para a maçã, a incidência à 'desordem de escurecimento interno' tem sido relacionada à composição mineral (Neuwald *et al.*, 2008; Correa *et al.*, 2012).

O cálcio é o principal elemento associado à qualidade de frutos e à ocorrência de desordens de escurecimento interno, pois o mesmo desempenha funções importantes na permeabilidade seletiva das membranas celulares bem como na respetiva estruturação e funcionalidade, através da ligação de fosfolípidos e de monogalactosídeos à superfície da membrana (Freitas *et al.*, 2010; Miqueloto *et al.*, 2011; Amarante *et al.*, 2013). No estudo efetuado em maçãs cv. 'Fuji', Correa (2010) verificou a existência de uma correlação entre a incidência e a severidade de degenerescência do fruto com a concentração de cálcio na polpa dos frutos.

Para além disso, teores elevados de potássio (K) e Magnésio (Mg) podem ser igualmente associados à ocorrência de escurecimento da polpa, tendo em conta que estes elementos competem pelos mesmos sítios de ligação do cálcio à membrana plasmática, embora não desempenhem a mesma função na manutenção de integridade e estrutura das membranas (Freitas *et al.*, 2010).

Independentemente do papel específico de cada nutriente mineral, a relação entre as respetivas concentrações no fruto é, igualmente, um fator importante na predisposição dos mesmos para o desenvolvimento de desordens de escurecimento interno.

Corrêa *et al.* (2012) observaram que maçãs com menores relações K/Ca e (K+Mg)/Ca apresentam menor predisposição à degenerescência de polpa. A região distal do fruto é a mais recomendada para a avaliação de atributos minerais em maçãs que apresentam "bitter pit", não apenas por ser a área de maior incidência aos sintomas mas também por possibilitar uma maior discriminação entre frutos com e sem "bitter pit" (Amarante *et al.*, 2013).

#### **2.5 Sistemas de deteção de desordens de escurecimento interno**

Existem muitas linhas de investigação com vista ao desenvolvimento da deteção de desordens de escurecimento interno nos frutos e que na situação ideal passaria pela utilização de métodos não destrutivos, de baixo custo e de fácil implementação técnica que permitissem prevenir antecipadamente o problema.

Neste âmbito, a utilização de sistemas de imagem, a detecção de compostos que funcionam como marcadores químicos e a correlação com indicadores de maturação são algumas das estratégias em desenvolvimento.

A técnica de fluorescência da clorofila (por tomografia axial computadorizada, ressonância magnética protônica, sondas moleculares e detetores de gases) tem sido utilizada na identificação de danos causados pelo frio em abóbora (Van Kooten *et al.*, 1992) banana e manga (Smillie *et al.*, 1987). A utilização desta técnica possibilitou, em certa medida, a detecção de desordens fisiológicas relacionadas com baixos teores de O<sub>2</sub> e elevados de CO<sub>2</sub> durante a armazenagem de maçãs. Da mesma forma as técnicas de imagem por fluorescência demonstraram ser ferramentas promissoras na detecção atempada de danos induzidos por condições de 'stress', em maçã. Através desta técnica foi ainda possível permitir a identificação de escurecimentos internos em maçãs cv Jonagold antes da manifestação de sintomas evidentes (Ciscato *et al.*, 2001). Segundo Valero *et al.* (2001) a técnica de espectroscopia de refletância difusa (time domain reflectance spectroscopy - TDSR) pode ser utilizada na identificação do amolecimento em maçãs ('mealiness') (Valero *et al.*, 2001). Apesar das técnicas referidas permitirem um diagnóstico rigoroso de desordens fisiológicas, o grau de sofisticação e os custos de implementação elevados dificulta / inviabiliza a respetiva implementação nas centrais hortofrutícolas.

A identificação de químicos marcadores, como é disso exemplo o ácido ascórbico tem sido alvo de intensa investigação. Na mesma linha, os teores em compostos voláteis (etanol, o acetaldeído e o etileno) são descritos como bons marcadores na identificação de lesões desenvolvidas em frutos sujeitos a diferentes condições de *stress* (frio, calor e desidratação) (Forney e Jordan, 1998). No entanto, encontra-se ainda por esclarecer se estes compostos permitem a detecção atempada de desordens de escurecimento interno em pera armazenada em condições de AC.

A necessidade de implementação de métodos práticos e menos dispendiosos nomeadamente os que se baseiam na caracterização dos índices de maturação dos frutos é igualmente uma estratégia de investigação em desenvolvimento. Crisosto *et al.* (1994) demonstraram que a cor superficial da pera chinesa apresenta-se como um indicador adequado no escurecimento interno dos frutos. No estudo de Pintó *et al.* (2010) as condições estabelecidas durante a armazenagem de pera em condições de AC (designadamente o período de armazenagem e a concentração de CO<sub>2</sub>) bem como a data de colheita foram identificadas (por análise multivariada) como os fatores determinantes na incidência dos distúrbios: 'brown heart' e 'core breakdown' dos frutos. Neste estudo, o 'brown heart' e o 'core breakdown' foram assinalados como desordens fisiológicas distintas tendo a manifestação da primeira tido lugar no curso dos primeiros três meses, prévio ao aparecimento do segundo. Foram ainda estabelecidas correlações entre os dois tipos de alterações fisiológicas e os índices de maturação. A incidência de coração pardo



correlacionou-se negativamente com a acidez dos frutos e a incidência de escurecimento interno foi correlacionado com a firmeza dos mesmos e com a acidez apresentando neste caso valores de correlação inferiores em comparação com o primeiro incidente.

## **2.6 Hortofrutícolas frescos cortados**

O consumo de frutas e hortícolas é essencial numa alimentação saudável. Esta ideia é reforçada pelas recomendações emitidas por várias organizações mundiais, como a WHO e a FAO, que aconselham o consumo de frutas e hortícolas para reduzir o risco de doenças cardiovasculares e para melhorar a condição física. Para o aumento deste consumo de hortofrutícolas, existe a opção rápida e prática para consumir estes alimentos que são os hortofrutícolas frescos cortados (HFC).

Hortofrutícolas frescos cortados (HFC) definem-se como produtos frescos, cortados, embalados e refrigerados apresentados ao consumidor numa forma conveniente e 100% comestível (Watada e Qi, 1999). O processamento tecnológico inclui operações de preparação que objetivam a eliminação das partes não edíveis e redução a dimensões adequadas (descasque e diversos tipos de corte / apresentação), operações de conservação que envolve tratamentos de natureza muito diversa contudo aplicados em baixa intensidade por forma a alterar no mínimo a qualidade em fresco. Estes produtos por definição embalados com utilização de filmes poliméricos semipermeáveis e mantidos em condições de refrigeração ao longo de toda a cadeia (fabrico, distribuição e venda).

### **2.6.1 Processamento mínimo**

O processamento mínimo apresenta como principal objetivo o fornecimento de produtos vegetais com qualidade próxima do estado em fresco, que possuam, tanto quanto possível, um período de vida alargado cumprindo simultaneamente requisitos de qualidade microbiológica, nutricional e sensorial. A descrição sumária das operações gerais de fabrico é apresentada na Tabela 1.

Tabela 1 - Descrição geral das operações envolvidas no processamento mínimo

<b>Operação unitária</b>	<b>Descrição</b>
1. Escolha e calibração das matérias-primas	Durante a fase de receção / armazenamento das matérias-primas procede-se a uma escolha preliminar para eliminação de materiais estranhos e unidades HF não conformes e respetiva calibração por forma a uniformizar a dimensão dos HF.
2. Lavagem preliminar dos produtos	Remoção da sujidade proveniente do campo (solo, areias e lamas) para diminuir a contaminação microbiológica inicial das matérias-primas.

<b>Operação unitária</b>	<b>Descrição</b>
3. Descasque	Nesta fase e quando adequado, os HF são descascados e são igualmente removidas as partes não edíveis. Idealmente, deveria ser realizado manualmente por forma a minimizar os danos físicos.
4. Corte (redução de dimensão)	A redução de dimensão é imposta pelo tipo de apresentação pretendida para o produto final e pelo tipo de estrutura vegetal.
5. Lavagem e descontaminação	Adição de agentes químicos de descontaminação para redução da carga microbiana e / ou de antioxidantes para prevenir reações de oxidação enzimática durante a armazenagem do produto. Pode ser realizada por imersão dos produtos em solução (parada ou corrente), com chuveiros, em tanques com agitação ou de tambor rotativo.
6. Enxaguamento	Visa a redução da concentração de agentes químicos desinfetantes utilizados na operação anterior para garantir quantidades residuais aceitáveis (valores legais) e a qualidade organolética dos produtos.
7. Remoção de água	Remoção da água superficial dos produtos para reduzir a atividade microbiológica. É realizada por centrifugação ou correntes de ar.
8. Embalamento	Conservação do conteúdo em sistemas de embalagem em atmosfera modificada (filmes poliméricos flexíveis ou embalagens impermeáveis rígidas) que previnem a degradação da qualidade e recontaminação do produto.
9. Armazenagem/Distribuição	O controlo da temperatura dos produtos (2 a 4 °C) é fundamental para minimizar a degradação da qualidade tendo em conta o reduzido período de vida útil.

(adaptado de Abreu, 2010)

### **2.6.2 Consequências do processamento mínimo na qualidade**

No processamento mínimo, as operações de descasque e corte promovem a degradação acelerada da qualidade em fresco uma vez que a partir do momento em que ocorre a rutura das células vegetais permite-se a libertação e a mistura dos conteúdos celulares, o contacto com o oxigénio e o acesso dos microrganismos. Em consequência, desencadeiam-se inúmeros processos bioquímicos e atividade microbiana, responsáveis pela degradação de diversos atributos da qualidade dos produtos, limitando o período conservação de HFC, mesmo sob condições de refrigeração.

O dano causado nos tecidos vegetais induz a biossíntese de etileno, que por sua vez, aumenta a taxa respiratória dos tecidos vegetais. A taxa respiratória é um bom indicador do tempo de conservação de produtos minimamente processados (Moreira, 2004). Burns (1995) afirma que os processos de senescência podem ser acelerados com o consequente desenvolvimento de odores indesejáveis

As principais alterações sensoriais verificadas na sequência do processamento mínimo correspondem a múltiplos processos de oxidação e despolimerização enzimática,

responsáveis pelas alterações de cor, de sabor / aroma e, de firmeza dos produtos (Laurila e Ahvenainen, 2002).

Com frequência, nos frutos frescos cortados, a perda da qualidade sensorial tem lugar antes da deterioração microbiológica condicionando-lhes o período de vida comercial, nomeadamente o escurecimento enzimático observado nas superfícies cortadas. Este tipo de alteração desenvolve-se rapidamente e tem um significativo impacto visual interferindo na aceitação sensorial dos produtos.

Na Tabela 2 apresentam-se os principais efeitos do processamento mínimo sobre a qualidade de frutos frescos cortados e as respetivas causas.

Tabela 2 - Efeitos do processamento mínimo na deterioração da qualidade dos frutos frescos cortados e respetivas causas.

Efeitos negativos	Principais causas
Aumento da suscetibilidade à desidratação	Remoção da casca e aumento da superfície de transpiração.
Acastanhamento das superfícies cortadas	Aumento da atividade enzimática (polifenoloxidase), devido ao contacto entre enzimas e substratos fenólicos promovidos pelo corte; Aumento da velocidade de amadurecimento e senescência.
Amolecimento excessivo dos tecidos vegetais	Degradação enzimática das paredes celulares (pectinases); Aceleração da senescência promovida pela maior taxa de libertação de etileno.
Formação de aromas desagradáveis	Aumento dos processos bioquímicos que conduzem à síntese de metabolitos secundários que influenciam o aroma. Ex.: reação de oxidação de ácidos gordos insaturados, catalisada pela lipoxigenase e peroxidase, dando origem a aldeídos e cetonas.
Perda de nutrientes	Aumento da taxa respiratória; Hidrólise enzimática; Lixiviação durante as operações de lavagem.
Aumento da atividade microbiológica	Transferência da flora microbiana da casca para o interior da polpa cujo ambiente é propício ao respetivo desenvolvimento.

(adaptado de Gorny *et al.*, 2000)

### 2.6.3 Conservação de hortofrutícolas frescos cortados

A conservação de HFC, com manutenção da qualidade e garantia da segurança microbiológica, à semelhança das matérias-primas (HF frescos inteiros) baseia-se na aplicação de múltiplas barreiras de conservação (cada uma de baixa intensidade) de forma a controlar os fenómenos responsáveis pela deterioração de origem fisiológica / bioquímica e o desenvolvimento microbiano.

As principais barreiras à conservação referem-se à utilização de baixa temperatura ao longo de toda a cadeia de produção, distribuição e venda, a aplicação de aditivos químicos (e.g. antimicrobianos, antioxidantes) e a embalagem em condições de atmosfera modificada. A otimização da aplicação integrada destes fatores, minimizando a intensidade de cada tratamento de per se, pode atuar de forma aditiva e/ou sinérgica em prol da conservação minimizando o impacto sobre a frescura dos produtos e aumentando o período de vida comercial.

A aplicação de tratamentos químicos pode desempenhar diferentes objetivos. Nos frutos, a respetiva utilização é muito difundida com vista à prevenção das reações de escurecimento enzimático e de alteração da textura. Por norma, estes tratamentos são efetuados por imersão dos produtos cortados em soluções (com um ou mais químicos), por tempos variáveis entre 1 e 5 minutos, seguidos de operações de enxaguamento com o propósito de minimizar a concentração de resíduos químicos para determinados limites máximos de resíduos (LMR) nos produtos. As concentrações utilizadas são específicas de cada hortofrutícola e dependentes dos agentes químicos empregue de acordo com a legislação em vigor de cada país.

A utilização de químicos desinfetantes é muito comum na operação de descontaminação parcial das matérias-primas com vista à redução da carga microbiana inicial (2 a 3 ciclos Log). A eficiência de descontaminação dos agentes químicos utilizados é variável, sendo dependente da microbiota presente e das características físico-químicas e morfológicas dos produtos. Neste âmbito, a descontaminação é efetuada pela imersão do produto cortado em soluções de hipoclorito de sódio refrigeradas (água clorada) (Simons e Sanguansri, 1997). Normalmente a concentração de cloro ativo utilizada situa-se na gama de 50 a 200 ppm, por períodos de 1 a 2 minutos, sendo o mesmo dependente do tipo produto (Beuchat, 1998). Atualmente questiona-se a capacidade real deste desinfetante na descontaminação de HFC com níveis de redução inferiores ao desejável (contagens após descontaminação na ordem de  $10^3$  UFC.g<sup>-1</sup> no que respeita à flora mesófila de acordo com Guerzoni *et al.*, (1996). De acordo com Kim *et al.*, (1999) a eficiência reduzida pode ser justificada pelo deficiente contacto entre os agentes desinfetantes e os microrganismos. A própria morfologia heterogénea dos vegetais origina locais de difícil acesso aos agentes de descontaminação (Seymour *et al.*, 2002).

Acresce às limitações do HIPO ao nível da qualidade microbiológica dos HFC, o facto de poder alterar o aroma (conferindo aroma a desinfetante), perda de nutrientes (por oxidação), e perda de cor (lixiviação de pigmentos), conduzindo à rejeição dos produtos pelo consumidor (Alegria *et al.*, 2009). Estas limitações associadas à utilização de hipoclorito de sódio, impulsionaram a investigação para a procura de alternativas de descontaminação no âmbito do processamento mínimo, entre as quais figura a aplicação de tratamentos térmicos moderados.

A aplicação de pré-tratamentos térmicos moderados, isto é aplicação de calor às matérias-primas previamente ao processamento mínimo, é referenciada como uma potencial alternativa para o processamento mínimo de pera 'Rocha' (Abreu *et al.*, 2011) não só pelos efeitos demonstrados ao nível da descontaminação como também por prevenir o escurecimento superficial do fruto cortado durante a armazenagem, sem prejuízo para os outros parâmetros da qualidade. Estes últimos efeitos estão associados ao facto de se impor um 'stress' às matérias-primas induzindo assim os respetivos mecanismos de defesa em detrimento da atividade fisiológica normal do produto.

A embalagem em atmosfera modificada (MAP) faz-se a substituição do ar existente no interior da embalagem (78% N<sub>2</sub>, 21% O<sub>2</sub>, 0,03% CO<sub>2</sub>) por uma mistura de gases apropriada. Os principais gases envolvidos na MAP são o dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), o oxigénio (O<sub>2</sub>) e o azoto (N<sub>2</sub>). Normalmente as concentrações gasosas no interior da embalagem situam-se nas gamas: de 1-5% para o O<sub>2</sub> e de 5-10% para o CO<sub>2</sub>. Nestas gamas é possível reduzir a deterioração com origens fisiológica e microbiológica. Os efeitos na taxa de respiração dos HF dependem da composição de O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> na atmosfera envolvente. Quando o tecido vegetal é armazenado em conteúdo de CO<sub>2</sub> mais elevado que na atmosfera normal, a taxa de respiração diminui e os tecidos climatéricos tornam-se menos sensíveis ao etileno. O dióxido de carbono também pode inibir o desenvolvimento de numerosos microrganismos. No entanto, como o CO<sub>2</sub> tem alguns efeitos citotóxicos, o seu conteúdo na atmosfera da embalagem de armazenamento deve ser controlado para não se ultrapassarem valores críticos.

A taxa de respiração dos tecidos vegetais também pode ser reduzida quando a concentração de O<sub>2</sub> no interior da embalagem é reduzida, mas ambientes de anóxia, ou seja, de ausência de oxigénio podem originar danos nos produtos frescos. A diminuição da concentração de O<sub>2</sub> e a elevação do CO<sub>2</sub> exercem efeitos independentes e, em muitos casos, sinérgicos sobre a respiração e sobre outros processos metabólicos. A velocidade de respiração reduz-se com baixos teores de O<sub>2</sub> e altas concentrações de CO<sub>2</sub>. Baixos teores de O<sub>2</sub> reduzem a produção de etileno nos tecidos vegetais e teores de CO<sub>2</sub> elevados inibem tanto a síntese quanto a ação do etileno (acelerador de maturação e causador de injúrias fisiológicas) bem como injúrias pelo frio e o desenvolvimento de microrganismos patogénicos no produto. Contudo, concentrações muito baixas de O<sub>2</sub> ou muito elevadas de CO<sub>2</sub>, ou ainda uma relação CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> muito elevada, podem ser indutoras de respiração anaeróbia e de desordens fisiológicas, como por exemplo promover o amadurecimento irregular, o desenvolvimento de sabor/odor indesejáveis e o aumento da suscetibilidade à deterioração. O desenvolvimento de sabor/odor estranhos ocorre em consequência da respiração anaeróbia, que leva a uma acumulação de etanol, acetaldeído e certos ácidos orgânicos. Geralmente isso ocorre para teores de O<sub>2</sub> inferiores a 2% e teores de CO<sub>2</sub> acima de 20%. Nas embalagens de HFC a anaerobiose é uma situação indesejável, pois além de

estar associada às injúrias fisiológicas, aumenta o risco de desenvolvimento de microrganismos patogénicos anaeróbios. A embalagem em atmosfera modificada otimizada pode criar condições favoráveis à manutenção da qualidade nutricional, microbiológica e sensorial e prolongar o período de vida útil, das HFC.

## Capítulo II - Desenvolvimento Experimental

---

### 3. Materiais e Métodos

#### 3.1 Material Vegetal

Os frutos de pera 'Rocha' (*Pyrus communis* L. 'Rocha') foram fornecidos pela empresa CAMPOTEC, sendo provenientes de três quintas distintas, localizadas na Região Oeste de Portugal (Alcobaça, Mafra e Lourinhã) da colheita de 2014. Segundo as informações disponibilizadas os frutos foram colhidos com estado de maturação caracterizado pelos seguintes índices de colheita: valores de firmeza entre 6,0 e 7,0 kg / cm<sup>2</sup>, teor de sólidos solúveis entre 10 e 11°Brix e a tonalidade da epiderme predominantemente amarelo-esverdeado.

Os frutos foram transportados dos pomares para a central frutícola e foram escolhidos frutos de forma aleatória manualmente e colocados em caixas de plástico devidamente identificadas para a realização dos respetivos ensaios.

#### 3.2 Métodos analíticos

##### 3.2.1 Incidência a desordens de escurecimento interno

A incidência de escurecimento de polpa (%) foi avaliada por meio de um corte na seção transversal dos frutos, onde foi realizada a contagem das peras que apresentavam regiões internas da polpa com qualquer tipo de escurecimento, sendo determinada a proporção de frutos afetados de cada origem. Na Figura 4 encontra-se registos fotográficos representativos de frutos com e sem as referidas desordens.



Figura 4 – Registos fotográficos representativos de frutos com e sem desordens, respetivamente.

### 3.2.2 Calibre

Os calibres foram determinados com o auxílio de uma craveira mecânica e correspondem à medição do diâmetro máximo da secção equatorial de 30 frutos de cada amostra analisada.

### 3.2.3 Determinação da cor CIELab

Os parâmetros da cor foram determinados com o auxílio do colorímetro CR 300 Minolta colorimeter (Osaka, Japan), no sistema CIELab (iluminante C). A calibração do colorímetro efetuou-se a partir do padrão de referência ( $L^* = 97,10$ ;  $a^* = 0,08$ ;  $b^* = 1,80$ ), sendo que os resultados expressam a média de 15 determinações por amostra. Por leitura direta no aparelho obtiveram-se os parâmetros  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$ , onde  $L^*$  representa a luminosidade da amostra (intervalo de variação entre 0 – preto e 100 – branco), o parâmetro  $a^*$  traduz as variações de cor entre vermelho (+60) e verde (-60) e o parâmetro  $b^*$  as variações entre amarelo (+60) a azul (-60). A aproximação das coordenadas  $a^*$  e  $b^*$  ao valor nulo indica cores neutras como o branco, o cinzento e o preto.

Para além dos parâmetros  $L^*a^*b^*$ , foram ainda calculadas a saturação ou cromaticidade da cor  $C^*$ , a tonalidade  $h^\circ$  (Hue) e o índice de escurecimento (WI). A cromaticidade  $C^*$  (Eq. 1) é uma medida do croma ou da saturação da cor e representa a distância ao eixo neutro. O atributo de cor Hue ( $h^\circ$ , Eq. 2 a 4) pode ser definido como o ângulo (0-360°) que transmite a tonalidade de cor. Os ângulos formados variam pelos eixos dos parâmetros  $a^*$  e  $b^*$ , definindo assim a tonalidade da cor, sendo que ângulos entre 0° e 90° correspondem aos vermelhos, laranjas e amarelos; de 90° a 180° os amarelos, amarelo-verdes e verdes; de 180° a 270° os verdes, cianos e azuis; de 270° a 360° os azuis, púrpuras, magentas e novamente os vermelhos (Dafne, s. d. *cit in* Alegria, 2007). Os atributos  $C^*$  e  $h^\circ$  são calculados através das seguintes expressões matemáticas:

$$C^* = \sqrt{(a^{*2} + b^{*2})} \quad (\text{Eq. 1})$$

$$h^\circ = \frac{\left(\arctg \frac{b^*}{a^*}\right)}{6.2832} \times 360, \text{ se } a^* > 0 \text{ e } b^* > 0 \quad (\text{Eq. 2})$$

$$h^\circ = 180 + \frac{\left(\arctg \frac{b^*}{a^*}\right)}{6.2832} \times 360, \text{ se } a^* < 0 \quad (\text{Eq.3})$$

$$h^\circ = 360 + \frac{\left(\arctg \frac{b^*}{a^*}\right)}{6.2832} \times 360, \text{ se } a^* > 0 \text{ e } b^* < 0 \quad (\text{Eq. 4})$$

Segundo Abreu (2010), o WI é o parâmetro que melhor correlaciona o escurecimento do interior da pera, sendo calculado pela resolução da seguinte expressão:

$$WI = 100 - \sqrt{(100 - L^*)^2 + a^{*2} + b^{*2}} \quad (\text{Eq. 5})$$



### **3.2.4 Determinação do pH**

O valor de pH foi medido no homogeneizado de pera, utilizando um potenciômetro (Crison Micro pH 2001, Crison Instruments, Espanha). Os valores médios resultam de 3 determinações por amostra.

### **3.2.5 Determinação do teor em sólidos solúveis (TSS)**

O teor em sólidos solúveis foi determinado no sumo obtido por filtração do fruto, utilizando um refratômetro digital (DR-A1, ATAGO Co Ltd., Japão). Os resultados são expressos em °Brix (percentagem de sólidos solúveis por 100 g de produto), e os resultados apresentados correspondem à média de 3 determinações por amostra.

### **3.2.6 Determinação do teor de Ácido Ascórbico Total**

A determinação do teor de ácido ascórbico total através da cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) foi realizada segundo o Documento CEN, TC 275/ WG9 N90.

O método baseia-se na extração do ácido ascórbico (AA) por ácido metafosfórico a 2% (m/v) e após redução do ácido dihidrascórbico a ácido ascórbico através da solução aquosa de cisteína a 4% (m/v), solução de fosfato de trissódico a 20% (m/v) e solução de ácido metafosfórico a 20%, injeta-se uma alíquota de 20µl de amostra que é eluída com uma fase móvel e passa através de uma coluna de fase reversa que permite separar os compostos de diferentes polaridades da amostra injetada.

Procedeu-se à injeção de 20µl de cada amostra nas seguintes condições: equipamento – HPLC marca Waters com detetor de ultravioleta/visível; coluna - Waters Spherisorb 5 µm ODS2, 4,6mmx250mm (fase reversa); fase móvel – 13,6g de dihidrogenofosfato de potássio + 900ml de água/1,82g de brometo de N-cetil-N,N,N-trimetilamónio + 100ml de metanol; fluxo da fase móvel – 1,2 ml/min; injetor – Rheodyne com loop de enchimento total de 20 µl; detetor de UV/VIS -  $\lambda = 265\text{nm}$ ; tempo de retenção – cerca de 10min. Para a obtenção dos resultados em mg de AA /100g produto procedeu-se do seguinte modo: Prepararam-se 5 padrões com concentração diferente de ácido ascórbico; obteve-se a reta de calibração através das áreas respetivas de cada padrão e após a injeção de cada amostra obteve-se a respetiva área que entra na equação da reta para assim se quantificar o teor de ácido ascórbico. Os resultados apresentados são o resultado da média de 4 determinações por amostra.

### **3.2.7 Determinação da Humidade**

A determinação da humidade tem como princípio a perda de massa do produto, quando submetido a secagem em estufa a  $103^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , até peso constante. Pesa-se o cadinho de

porcelana, depois de seco em estufa a  $105^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante uma hora e arrefecido em exsiccador, com a vareta. Adiciona-se uma toma do produto (5g) e homogeneiza-se a mistura, com a ajuda da vareta. Seca-se durante 4 h em estufa de vazio, à temperatura de  $105^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Deixa-se arrefecer em exsiccador e pesa-se.

Efetua-se depois sucessivas secagens, como a anteriormente descrita, mas durante uma hora cada, até a massa obtida em duas pesagens consecutivas não diferir mais de 2 mg.

A Humidade do produto é expressa em (%) a partir da seguinte equação e os resultados apresentados correspondem à média de 2 determinações por amostra.

$$\frac{m2 - m3}{m2 - m1} \times 100, \text{ em que}$$

m1= peso do conjunto cadinho+ vareta

m2= peso do conjunto+ amostra

m3= peso do conjunto+ amostra após secagem

### 3.2.8 Determinação do Teor de Minerais

Após a secagem a amostra é colocada na mufla a  $550 \pm 50^{\circ}\text{C}$ , para a remoção da fase orgânica. A cápsula permanece na mufla até a amostra estar completamente incinerada (cinza branca), arrefecida num exsiccador e posteriormente pesada em balança de precisão.

A determinação do teor de minerais é baseada no método de Vandecasteele e Block (1993).

Adiciona-se 10 mL de uma solução aquosa de ácido nítrico (1:1) à cinza previamente obtida. Esta solução é “digerida” em banho-maria a  $95^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos, filtrada para um balão de 100 mL e adicionada água MilliQ até completar o volume.

Procedeu-se à determinação dos minerais por espectrometria de absorção atômica, no laboratório de Química do Instituto Superior de Agronomia., e os resultados apresentados correspondem à média de 2 determinações por amostra.

### 3.2.9 Determinação da firmeza

A firmeza foi determinada por um teste de penetração num texturómetro TA.HDi Texture Analyzer (Stable Microsystem Ltd, Godalming, UK), equipado com uma célula de carga de 50 kg, como é demonstrado na Figura 5. O teste de penetração foi realizado a uma velocidade de  $1 \text{ mm.s}^{-1}$  com uma distância de penetração de 10 mm, com recurso a uma sonda de inox de 2 mm de diâmetro. As curvas de força-distância foram registadas e a firmeza tomada como o pico de força máximo (N) das curvas. A determinação foi efetuada à temperatura ambiente, sendo os frutos primeiramente estabilizados a essa condição de

temperatura. Os resultados foram expressos como a média de 16 determinações por tipo de amostra.



Figura 5 - Teste de penetração em frutos de pera 'Rocha';

### 3.2.10 Determinação do teor de Compostos Fenólicos Totais

A técnica utilizada para a determinação do conteúdo fenólico total teve por base o método descrito por Swain & Hillis (1959). O extrato foi obtido através da homogeneização de 5 g de pera em 20 ml de metanol, utilizando um polytron Yellow line DI 25 basic (IKA-Werke GmbH & Co.KG, Staufen, Alemanha) e incubação overnight a 4 °C. Após a obtenção do extrato límpido por centrifugação a 29000 g durante 15 min a 4 °C (RC5C Sorvall Instruments, rotor n. SS-34), 150 µL do extrato metanólico foram diluídos em 2400 µL água nanopura, seguido pela adição de 150 µL do reagente de Folin-Ciocalteu a 0,25 N. Após permitir a reação da mistura por 3 min, foram adicionados 300 µL Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a 1 N, incubando a mistura final durante 2 h no escuro (temperatura ambiente). As leituras espectrofotométricas a 725 nm foram obtidas utilizando um espectrofotómetro ATI Unicam UV/VIS 4 (Unicam Sistemas Analíticos, Lisboa, Portugal).

O Conteúdo fenólico total foi expresso em mg equivalentes de ácido clorogénico.100 g<sup>-1</sup>, resultantes da média de n = 3 determinações por amostra, tendo sido calculado a partir da interpolação dos valores de absorvância na curva de calibração desenvolvida com este padrão (0 – 0,30 mg/mL).

### 3.2.11 Determinação da acidez titulável

A determinação da acidez titulável (AT) foi realizada em duplicado de acordo com a norma portuguesa NP-1421(1977), com algumas alterações.

Após homogeneização da amostra, procedeu-se à sua filtração, utilizando papel de filtro Whatman Nº 41. Recolheu-se 25 mL do filtrado para um balão de 250 mL perfazendo-se o volume com água destilada. 25 mL desta solução foi titulada com uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) a 0,1 M, usando fenolftaleína a 1% como indicador.

A acidez titulável apresenta-se expressa pela concentração equivalente de ácido málico (g/L), e os resultados apresentados correspondem à média de 2 determinações por amostra.

### **3.3 Métodos estatísticos**

O tratamento estatístico de resultados foi efetuado com recurso ao software, Statistica<sup>TM</sup> v8.0 (Statsoft, Inc., 2007).

#### **3.3.1 Análise de variância (ANOVA)**

Para separação de médias utilizou-se o teste Tukey com um nível de significância de 5%.

#### **3.3.2 Análise Multivariada**

##### **3.3.2.1 Análise de Clusters**

A análise de Clusters estuda todo um conjunto de relações interdependentes e teve como objetivo encontrar e separar as variáveis em grupos similares (Vicini, L., 2005). Este método da análise exploratória procede ao agrupamento dos objetos em função da informação existente, de tal modo que objetos pertencentes a um mesmo cluster sejam o mais semelhantes possível e os objetos pertencentes clusters diferentes sejam o mais dissemelhantes possível. O agrupamento foi representado através de dendogramas verticais. A leitura é feita da direita para a esquerda, onde o eixo y indica as distâncias entre os grupos formados e o eixo x representa os grupos unidos por ordem decrescente de semelhança. Antes da análise, as variáveis foram previamente padronizadas.

##### **3.3.2.2 Análise fatorial e Análise em Componentes Principais**

A análise fatorial (AF) refere-se a conjunto de técnicas relacionadas, para tornar os dados observados mais claros para a interpretação. Analisa-se os inter-relacionamentos entre as variáveis, de modo que estas possam ser descritas convenientemente por um grupo de categorias básicas, chamados fatores. Os fatores explicam a variância das variáveis observadas, tal como se revelam pelas correlações entre as variáveis que estão em análise (Vicini, 2005). Um dos principais métodos para a extração dos fatores é feito por meio da análise dos componentes principais. A análise de componentes principais (PCA) transforma um conjunto original de variáveis em outro conjunto: os componentes principais (CP) de dimensões equivalentes (Vicini, 2005). A componente principal é o arranjo que melhor representa a distribuição dos dados e a componente secundária é perpendicular à componente principal. Pretende-se com esta análise determinar as variáveis de maior influência na formação de cada componente.

## **4. Resultados Experimentais**

Foram conduzidos 4 ensaios, em frutos de pera 'Rocha', oriundos de diferentes produtores (3 quintas) inseridos na região do Ribatejo e Oeste, sujeitos ao acondicionamento em condições de atmosfera controlada dinâmica (ACD; 4 meses) (Anexo 1), com os seguintes objetivos: identificar os fatores que condicionam a suscetibilidade de pera 'Rocha' a acidentes fisiológicos de escurecimento interno (EI), conhecer as relações do EI com os teores de ácido ascórbico e compostos fenólicos totais, caracterizar a capacidade de amadurecimento à temperatura ambiente e, avaliar a aptidão tecnológica para processamento mínimo, em função da origem geográfica dos frutos.

Os resultados são apresentados e discutidos segundo os seguintes tópicos:

- Relação entre parâmetros da qualidade do fruto e a incidência de manifestação a desordens de escurecimento interno;
- Distribuição espacial do ácido ascórbico e dos compostos fenólicos totais na polpa dos frutos;
- Potencial de amadurecimento à temperatura ambiente;
- Aptidão para processamento mínimo.

### **4.1 Relação entre parâmetros da qualidade do fruto e a incidência de manifestação a desordens de escurecimento interno**

#### **4.1.1 Objetivo e delineamento experimental**

Este ensaio teve por objetivo identificar as causas que possam justificar a distinta vulnerabilidade a distúrbios de escurecimento interno apresentada em frutos de pera 'Rocha' com diferentes origens de produção, dentro da região do Oeste, com base na qualidade intrínseca dos frutos, nomeadamente nos índices de maturação pós-colheita, nos teores de ácido ascórbico e de minerais. Neste sentido efetuou-se a caracterização de diferentes atributos da qualidade em frutos de pera 'Rocha' submetidos às mesmas condições de armazenagem (ACD) e com diferentes proveniências geográficas (Alcobaça, Mafra e Lourinhã). Com o objetivo de justificar os mecanismos subjacentes foram estabelecidas correlações entre os atributos da qualidade testados e a incidência a distúrbios de escurecimento interno.

Os frutos de pera 'Rocha' utilizados neste ensaio (ensaio I) são provenientes de 3 quintas (Amaros (id: A), Baptista (id: B) e Quinta do Rol (id: C)) com as seguintes localizações geográficas (Alcobaça (A), Mafra (B) e Lourinhã (C)), tal como se apresenta na Figura 6. Os frutos permaneceram armazenados em condições de ACD (cf. condições em Anexo I) durante 4 meses. Após a abertura das câmaras os mesmos foram acondicionados em

condições de refrigeração (ca de 2 meses, a 0/1 °C) e atmosfera normal, até serem analisados (Figura 7):

Os lotes foram constituídos a partir de frutos (ca de 50 kg) de cada proveniência.

O protocolo analítico deste ensaio incluiu as seguintes determinações: calibre dos frutos, pH, TSS, acidez titulável, humidade, teor de ácido ascórbico, teor de compostos fenólicos totais, firmeza, teor em minerais, parâmetros da Cor CIELab e de % incidência a distúrbios de escurecimento interno.

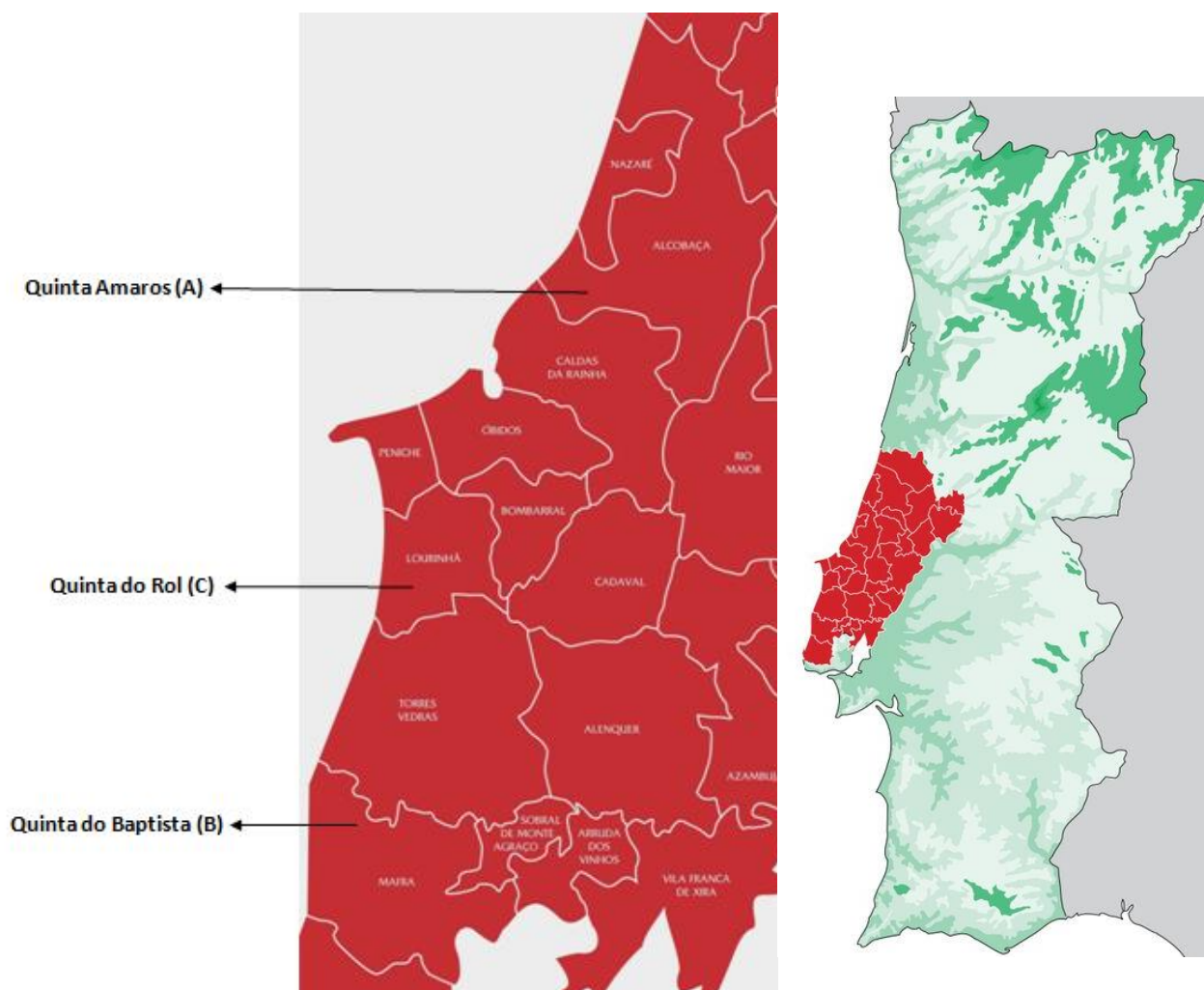


Figura 6 - Identificação da região geográfica das Quintas produtoras dos frutos de pera 'Rocha' utilizados neste estudo. Adaptado de CODIMACO

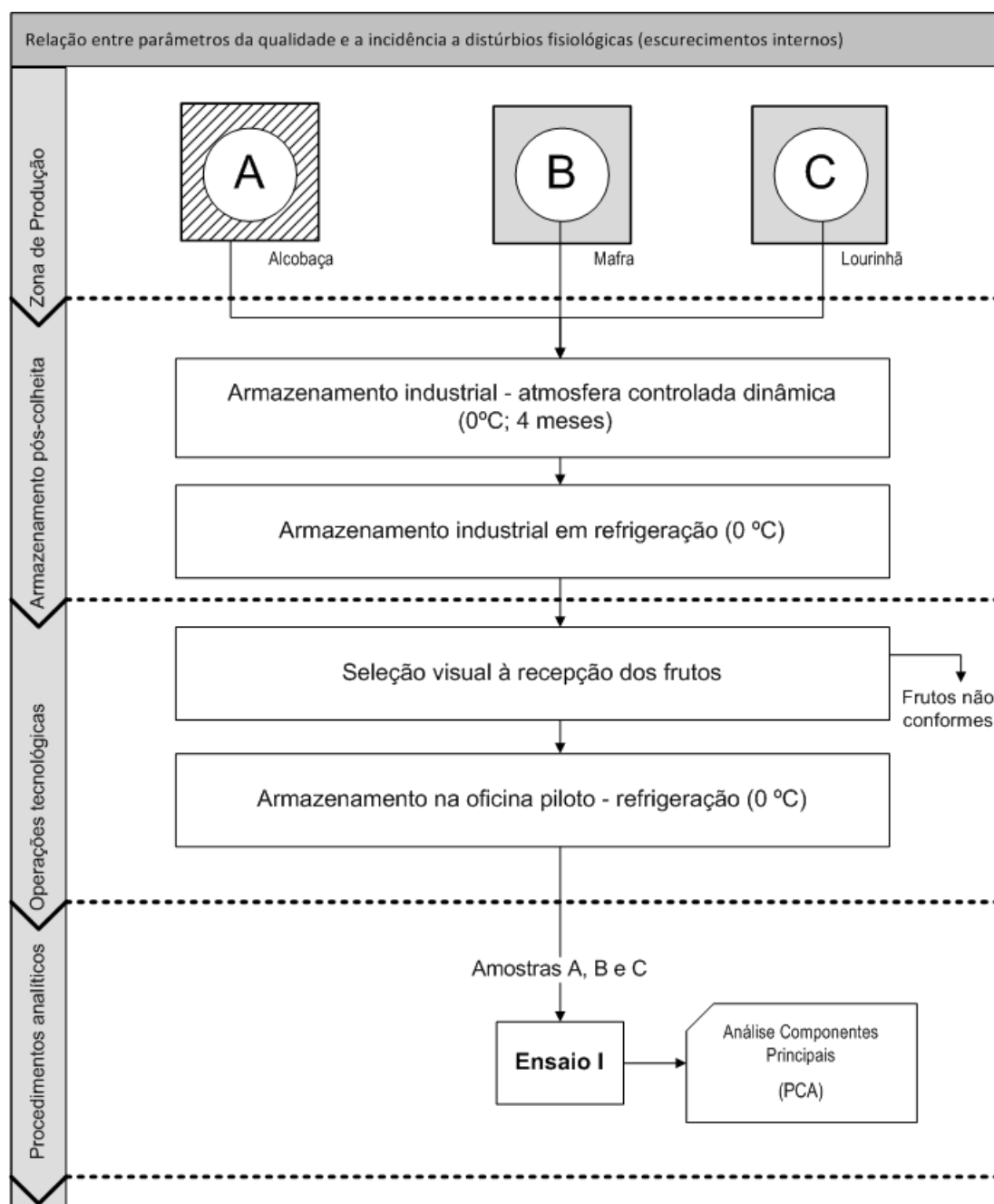


Figura 7 - Diagrama de delineamento experimental e tratamento de resultados do ensaio I.

#### 4.1.2 Resultados e discussão

##### Registo fotográficos







Quinta	Exterior do fruto	Secção transversal
Amaros (A)		
Baptista (B)		
Quinta do Rol (C)		

Figura 8 - Registos fotográficos das amostras analisadas no ensaio I

Os registos fotográficos apresentados na Figura 8, por quinta, evidenciam que, apesar da coloração normal da epiderme dos frutos, independentemente da sua proveniência, o interior (secção transversal) denota a manifestação de sintomas de escurecimento na zona central. As desordens de escurecimento interno, assim identificadas, foram verificadas nos frutos das quintas B e C, sendo que nenhum dos frutos da quinta Amaros denotou a presença destes sintomas.

##### Condições de armazenagem pós-colheita

No Anexo I, são apresentados os registos mensais da composição atmosférica ( $O_2$  /  $CO_2$ ) obtidos a partir do sistema de monitorização da câmara de atmosfera controlada dinâmica (ACD), onde todos os frutos (independentemente da proveniência geográfica) permaneceram durante 4 meses (Setembro a Dezembro de 2014).



As pressões parciais de O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> variaram, respetivamente, de 0 a 21 kPa e de 0,2 a 1,8 kPa, correspondendo, após a estabilização das condições, a valores médios de 0,8 kPa para o O<sub>2</sub>, e, de 0,4 kPa para o CO<sub>2</sub>, (não contabilizando os 4 dias iniciais),

Segundo Deuchande (2012) e Galvis-Sanchez e Morais (2001), as pressões parciais recomendadas para a pera 'Rocha' são: de 2-3 kPa O<sub>2</sub> e de 0,5-1,5 kPa CO<sub>2</sub>. Neste sentido as condições de ACD a que se submeteram os frutos utilizados neste estudo foram bastante distintas das condições recomendadas, em particular, no que se refere às pressões parciais de O<sub>2</sub> cuja pressão parcial foi em média <1 kPa.

Em peras armazenadas sob pressão parciais de O<sub>2</sub> muito baixas e/ou de CO<sub>2</sub> muito elevadas podem estabelecer-se condições de hipóxia no centro do fruto, na dependência da resistência dos tecido da polpa à difusão destes gases (Lammertyn *et al.*, 2003; Ho *et al.*, 2006b). Quando tal sucede estão criadas as condições de 'stress' oxidativo conduzindo à alteração do metabolismo respiratório, de preferencialmente aeróbio para anaeróbio. Em consequência da alteração do metabolismo respiratório verifica-se a deficiência de fornecimento de energia necessária aos diferentes processos bioquímicos e para a reparação de danos nas membranas celulares induzidos pelas espécies reativas de oxigénio (ROS) (Larrigaudière *et al.*, 2001). Na sequência da danificação celular a célula perde a compartimentalização, facilitando o contato entre enzimas (ex. PPO) e substratos fenólicos responsáveis pelo escurecimento da polpa dos frutos (Franck *et al.*, 2007; Pedreschi *et al.*, 2009).

### Incidência a desordens de escurecimento interno, calibre e firmeza dos frutos

Na Tabela 3 são apresentados os valores percentuais da incidência a desordens de escurecimento interno (% de EI), os calibres e, os valores médios de força máxima, avaliados nos frutos de pera 'Rocha', em função da proveniência geográfica.

Tabela 3 - Incidência a EI (%), calibre e valores médios de força máxima (±DP) avaliados nas amostras de pera 'Rocha' (A, B e C).

Quinta	Proveniência	Id_am	Incidência Ei (%)	Calibre* (mm)	Força Máxima (N)
<b>Amaros</b>	Alcobaça	A	0	59±3	10,7 <sup>a</sup> ±1,6
<b>Baptista</b>	Mafra	B	43	63±3	11,0 <sup>a</sup> ±1,7
<b>Quinta do Rol</b>	Lourinhã	C	28	60±7	10,9 <sup>a</sup> ±1,2

\*Diâmetro máximo da secção equatorial

Valores médios com letras diferentes representam diferenças significativas a p=0,05 (Teste de Tukey).

Tal como se pode verificar na Tabela 3, a incidência a EI (%) nas amostras de pera 'Rocha' demonstrou grandes diferenças em função da origem geográfica. Assim, os frutos

provenientes da Quinta Amaros (amostra A), de Alcobaça, apresentaram-se consistentemente sem qualquer evidência de sintomas (0% de EI).

Os valores calculados de EI mostram uma maior suscetibilidade dos frutos da amostra B (43%) face aos da amostra C (28%). Por ordem crescente de % de incidência a EI em função da origem geográfica dos frutos, temos: Alcobaça (0%) <Lourinhã (28%) <Mafra (43%).

No que se refere ao calibre, todas as amostras analisadas apresentaram calibre classificado como “Extra” (Reg. 543/2011), tendo em conta que o diâmetro máximo da secção equatorial foi sempre superior a 55 mm. No entanto, os frutos da amostra A apresentaram um calibre ligeiramente inferior, pertencente ao intervalo 55/60 mm, sendo as restantes amostras (B e C) classificadas na gama imediatamente superior, de 60/65 mm. Esta última classe de calibre corresponde ao calibre médio de comercialização dos frutos de pera ‘Rocha’ (Caderno de especificações, ANP, 1997).

Os valores de força máxima entre amostras (A, B e C), a variar entre 10,7 N a 10,9 N, não apresentam diferenças significativas ( $p>0,05$ ) entre si.

### Cor CIELab

Nas Figuras 9 e 10, são apresentados, respetivamente, os resultados da tonalidade do epicarpo ( $h^0_{Ext}$ ) e do índice de escurecimento da polpa ( $WI_{Int}$ ) das amostras em avaliação.

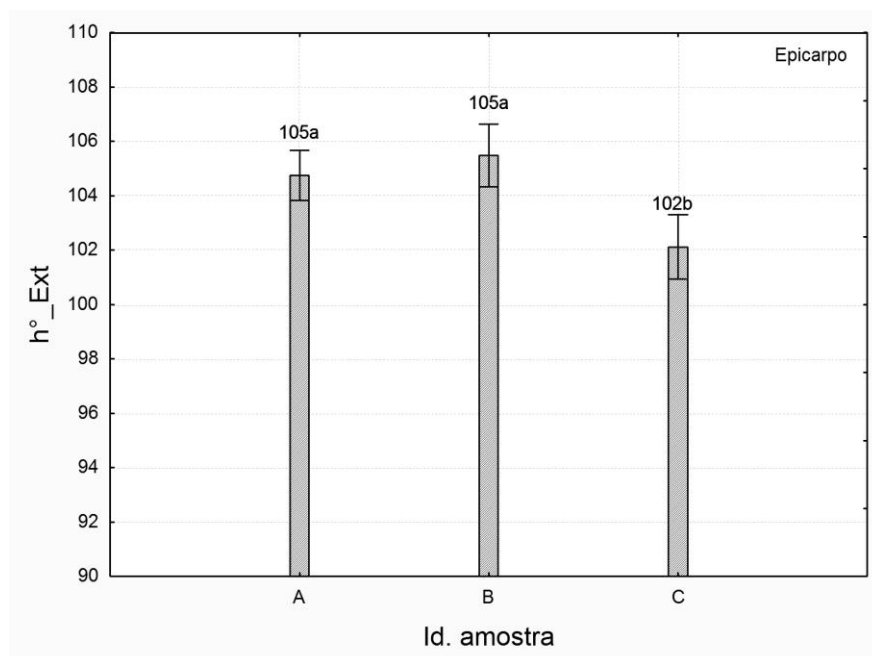


Figura 9 – Valores médios de  $h^0$  da polpa dos frutos analisados. Barras verticais correspondem ao intervalo de confiança a 95%. Valores médios com letras diferentes

representam diferenças significativas a  $p=0,05$  (Teste de Tukey).

A tonalidade do epicarpo (Fig. 9) variou em função do tipo de amostras. As amostras A e B não revelaram diferenças significativas entre si, apresentando valores médios de  $105^\circ$ , mas distinguiram-se ( $p<0,05$ ) da amostra C (Quinta do Rol) por apresentar valores médios de  $h^\circ$  inferiores. Esta diferença ( $\Delta h > 2,5^\circ$ ) foi perceptível visualmente e traduz para os frutos da amostra C ( $p < 0,05$ ) tonalidades mais próximas do amarelo. Este fato, pode ser interpretado como os frutos da amostra C se encontrarem num estado de maturação pós-colheita mais avançado. Faz-se notar que todos os frutos, independentemente da origem geográfica, apresentaram níveis de aceitação relativamente ao aspeto exterior esperado para consumo em natureza.

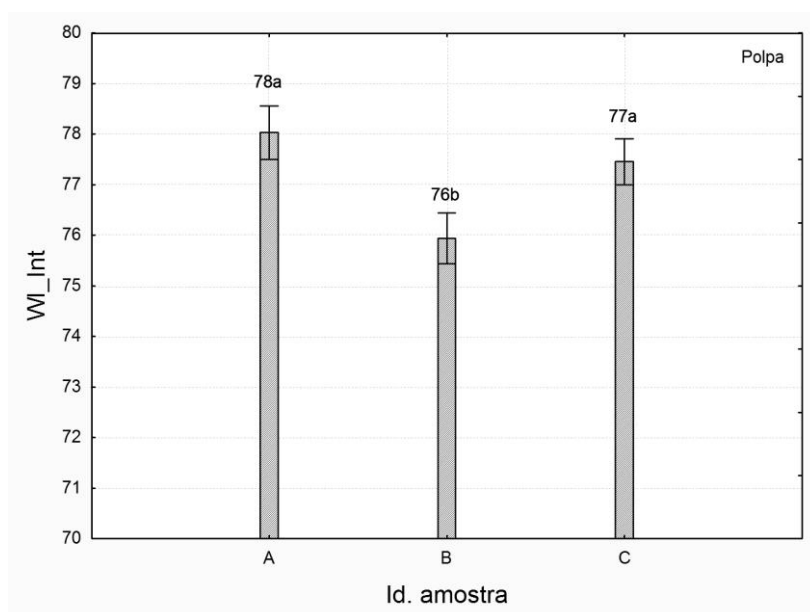


Figura 10 – Valores médios de WI referentes Às amostras A, B e C. Barras verticais correspondem ao intervalo de confiança a 95%. Valores médios com letras diferentes representam diferenças significativas a  $p=0,05$  (Teste de Tukey).

Os valores de WI, que reflete o índice de escurecimento, da polpa apresentados na Figura 10, mostram variações ( $p < 0,05$ ) em função do tipo de amostra. A amostra B destaca-se das restantes por apresentar valores de WI inferiores ( $p < 0,05$ ), traduzindo para a polpa destes a percepção de cor mais escura. Este resultado é concordante com o valor elevado de EI (43%) calculado nas mesmas amostras, uma vez que os sintomas refletem zonas de escurecimento. No entanto, as diferenças de incidência de EI entre as amostras A (0%) e C (28%) (Tabela 3) não se refletiram em diferenças de WI, apresentando valores similares ( $p < 0,05$ ).

## pH, TSS, Acidez titulável e Humidade

Na Tabela 4 são apresentados os valores médios de pH, TSS (°Brix), acidez titulável (g ácido málico/L) e teor de Humidade relativos às amostras (A,B e C).

Tabela 4 - Valores médios ( $\pm$ DP) de pH, TSS, AT e humidade dos frutos avaliados nas amostras de pera 'Rocha' (A, B e C).

Quinta	Id_am	pH	TSS (°Brix)	AT (g/L)	Humidade (%)
Amaros	A	4,8 <sup>a</sup> $\pm$ 0,2	10,7 <sup>a</sup> $\pm$ 0,5	0,9 <sup>a</sup> $\pm$ 0,2	88,4 <sup>a</sup> $\pm$ 0,5
Baptista	B	4,9 <sup>a</sup> $\pm$ 0,3	11,1 <sup>a</sup> $\pm$ 0,6	1,0 <sup>a</sup> $\pm$ 0,1	88,2 <sup>a</sup> $\pm$ 0,5
Quinta do Rol	C	4,7 <sup>a</sup> $\pm$ 0,3	11,0 <sup>a</sup> $\pm$ 1,4	0,7 <sup>a</sup> $\pm$ 0,1	87,4 <sup>a</sup> $\pm$ 0,2

Valores médios com letras diferentes representam diferenças significativas a  $p=0,05$  (Teste de Tukey).

Os valores médios de pH entre amostras, a variar de 4,7 a 4,9, não revelam diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre si e refletem valores característicos para este fruto.

Da mesma forma o teor de sólidos solúveis entre amostras, na ordem de 11 °Brix não revelou diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre si. Este valor de TSS situa-se abaixo do limite exigido para a comercialização das peras (11,5 °Brix) indicando por isso a incompleta maturação comercial dos frutos.

Os valores de acidez titulável entre amostras, expressos em gramas de ácido málico por litro, a variar entre 0,7 g/L e 1,0 g/L, não revelaram diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre si. Estes valores situam-se abaixo dos valores indicados para o fruto no momento da colheita, de 2-3 g/L de ácido málico, segundo o caderno de especificações da pera 'Rocha' D.O.P (ANP, 2009), mas são da mesma ordem de grandeza dos valores de AT referido para frutos após armazenagem prolongada quer em condições de AC (Carvalho, 2011).

Os valores de humidade entre amostras, a variar de 87,4% a 88,4%, não apresentaram diferenças significativas entre si e, refletem valores esperados neste fruto.

## Minerais

Na Tabela 5, são apresentados os valores médios do teor em minerais, nas amostras de pera 'Rocha' analisadas.

Tabela 5 - Valores médios ( $\pm$ DP) do teor mineral dos frutos relativos às amostras A, B e C, expressos em mg por 100g de fruto (PF).

Macronutrientes (mg/100g)					Micronutrientes (mg/100g)			
Id_am	Na	K	Ca	Mg	Fe	Cu	Zn	Mn
A	2,4 $\pm$ 1,4	118,2 $\pm$ 6,2	1,6 $\pm$ 0,2	5,7 $\pm$ 0,9	0,7 $\pm$ 0,2	0,1 $\pm$ 0,03	0,1 $\pm$ 0,06	0,1 $\pm$ 0,05
B	2,4 $\pm$ 2,1	155,4 $\pm$ 20,9	1,3 $\pm$ 0,7	5,4 $\pm$ 1,7	0,3 $\pm$ 0,1	0,1 $\pm$ 0,01	0,2 $\pm$ 0,3	0,1 $\pm$ 0,08
C	3,7 $\pm$ 2,7	118,7 $\pm$ 28,1	1,7 $\pm$ 0,3	6,1 $\pm$ 0,5	0,4 $\pm$ 0,1	0,1 $\pm$ 0,06	0,1 $\pm$ 0,06	0,2 $\pm$ 0,1

Os teores assinalados foram, de forma geral, consistentes com os valores de referência (Anexo III). Pela análise dos resultados (Tab. 5) é possível perceber que, apesar de não significativas ( $p > 0,05$ ), existem diferenças no teor de minerais entre tipo de amostras, nomeadamente no que se refere aos macronutrientes, sódio (Na), cálcio (Ca), potássio (K), magnésio (Mg) e, do micronutriente, ferro (Fe).

Existem estudos que relacionam o teor mineral dos frutos com a ocorrência de desordens de escurecimento interno, com especial destaque para o Ca, o Mg e o K. pois são conhecidos por ter grande influência na resistência a desordens fisiológicas (Ferguson *et al.*, 1999). Maçãs ‘Fuji’ armazenadas em AC com manifestação severa de sintomas de EI apresentaram teores de Ca inferiores face a frutos menos afetados (Freitas *et al.*, 2010; Amarante *et al.*, 2013). À semelhança, neste ensaio os frutos da amostra B de elevada % de EI corresponderam a frutos com menores teores de cálcio.

Da mesma forma, teores elevados de potássio têm sido correlacionados com a incidência a desordens de escurecimento interno em maçãs (Neuwald *et al.*, 2008; James *et al.*, 2009). O K relaciona-se de forma antagónica com o Ca nos mesmos locais de ligação à membrana plasmática (James *et al.*, 2009). A avaliação de teores de K elevados nos frutos da amostra B, nos quais foi caracterizada uma elevada incidência de EI, é consistente com o anteriormente descrito.

Os teores de Mg relacionam-se com o EI da mesma forma que o K, uma vez que este mineral compete igualmente nos mesmos locais de ligação à membrana plasmática (Freitas *et al.*, 2010; Amarante *et al.*, 2013). No entanto, os teores de Mg avaliados nas amostras (A, B e C) não traduzem esta relação.

### Ácido Ascórbico Total e Compostos Fenólicos Totais

Na Figura 11 e 12 são apresentados os valores médios de ácido ascórbico total (AA) e de compostos fenólicos totais (CFT), respetivamente, expressos em mg por 100g de fruto (parte edível).

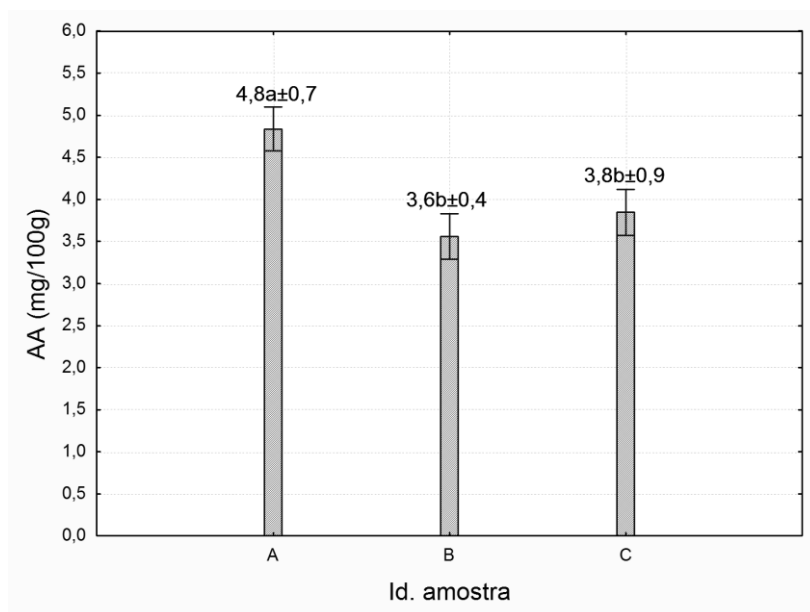


Figura 11 – Valores médios de AA das amostras A, B e C. Barras verticais correspondem ao intervalo de confiança a 95%. Valores médios com letras diferentes representam diferenças significativas a  $p=0,05$  (Teste de Tukey).

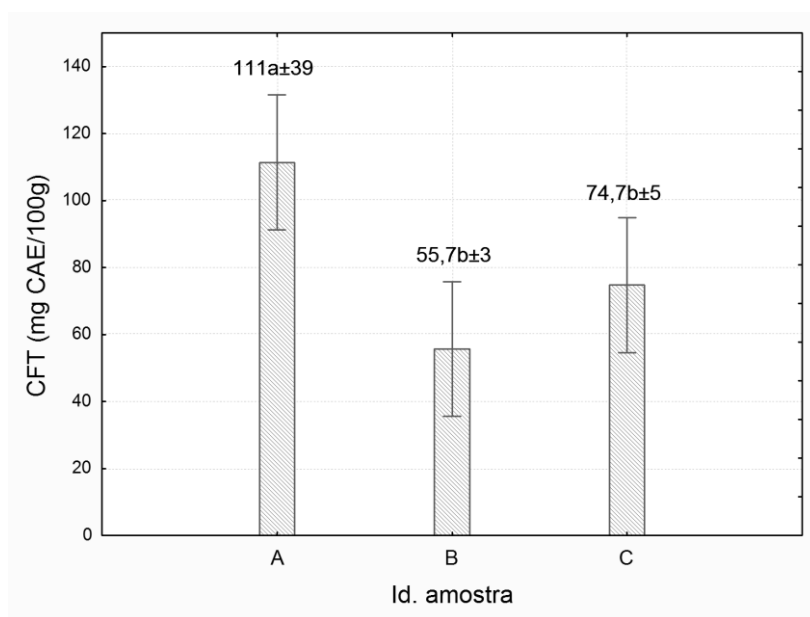


Figura 12 – Valores médios de compostos fenólicos totais (CFT) das amostras A, B e C. Barras verticais correspondem ao intervalo de confiança a 95%. Valores médios com letras diferentes representam diferenças significativas a  $p=0,05$  (Teste de Tukey).

O teor em ácido ascórbico total nas diferentes amostras apresentou uma amplitude de variação, de 3,6 a 4,8 mg/100 g. Na pera 'Rocha' Valores desta ordem de grandeza são característicos desta cultivar, tendo em conta que este fruto veicula baixos teores de vitamina C. Galvis-Sánchez (2004) determinou um valor de 4,4 mg /100 g e, Veltman *et al.*

(2000) valores de 8,2 mg /100 g e 6,1 mg /100 g em frutos pertencentes ao mesmo ano de produção mas, provenientes de áreas geográficas distintas.

Os teores de AA nas amostras A, provenientes de Alcobaça, foram significativamente superiores ( $p < 0,05$ ) aos contabilizados nas restantes amostras. Por ordem decrescente do teor de ácido ascórbico temos: amostra A > amostra C > amostra B. Por outro lado, os baixos teores de AA podem ser atribuídos à armazenagem CA (4 meses) condição que se sabe promover perdas de AA (Franck *et al.*, 2003).

O teor em CFT nas amostras A, B e C, variou de 55,7 a 111,0 mg CAE/ 100 g, apresentando seguinte ordenação: A > C > B, semelhante à caracterizada face aos teores em ácido ascórbico.

Os compostos fenólicos totais avaliados pelo método utilizado (de Folin), expressam indiretamente a capacidade antioxidante atribuída ao fruto, predominantemente à presença de ácidos fenólicos, em particular ao ácido clorogénico (Murata *et al.*, 1992). No entanto, a capacidade antioxidante do ácido ascórbico é igualmente contabilizada pelo método, fato que pode justificar a correlação positiva entre as duas determinações.

Estes resultados sugerem uma relação forte entre a capacidade antioxidante do fruto e a incidência a desordens de escurecimento interno uma vez que nas amostras A, em que os teores de CFT são duplos face às restantes amostras, foram os mesmos que denotaram ausência de sintomas. Esta mesma relação foi encontrada por Pintó (2001) e Zerbini (2002) salientando a importância da atividade antioxidante como mecanismo de prevenção ao 'stress' oxidativo que lhe está na origem.

### **Correlação múltipla dos resultados**

Os resultados obtidos no ensaio foram submetidos a análise de *Cluster* com o objetivo de agrupar as amostras A, B, C (localização geográfica) em função dos atributos da qualidade analisados.

O dendograma apresentado na Figura 13 representa a árvore hierárquica relativa às amostras (A, B e C) de frutos de pera 'Rocha', de acordo com o 'Complete-Linkage Method', tendo como critério de agregação os resultados dos atributos testados.

Em termos de distância euclidiana, o intervalo maior, foi verificado entre as amostras B face às amostras A e C. A proximidade entre as amostras A e C (distância <5,3) traduz, nas mesmas maior homogeneidade face aos atributos analisados.

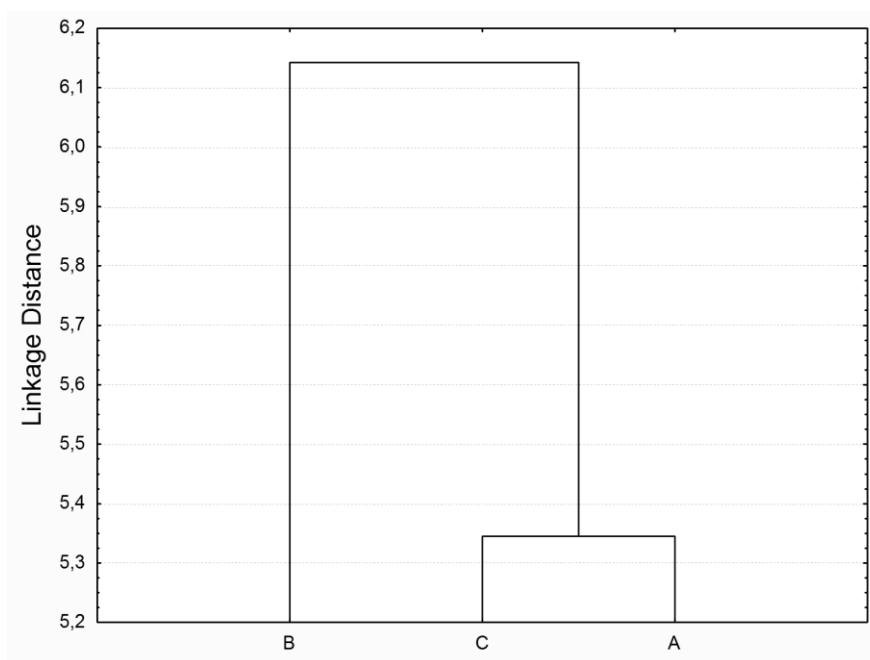


Figura 13 - Dendograma das amostras de frutos analisados.

Os resultados obtidos foram submetidos a uma análise fatorial com o objetivo de agrupar as variáveis em componentes principais. Na Figura 14 é apresentado o gráfico das projeções espaciais da ordenação dos vetores das variáveis com maior importância: incidência a EI, análise mineral (Cu, Na, Mn, Mg, Ca, Fe, K e Zn), TSS, força máxima (F. Máx.), luminosidade da polpa ( $L^*_{Int}$ ), tonalidade da epiderme ( $h^0_{Ext}$ ), acidez, calibre, CFT e AA, sendo que as duas componentes principais justificam a variabilidade total.

Na Figura 15 é apresentado o gráfico da projeção espacial das amostras, no plano definido pelas duas componentes principais.



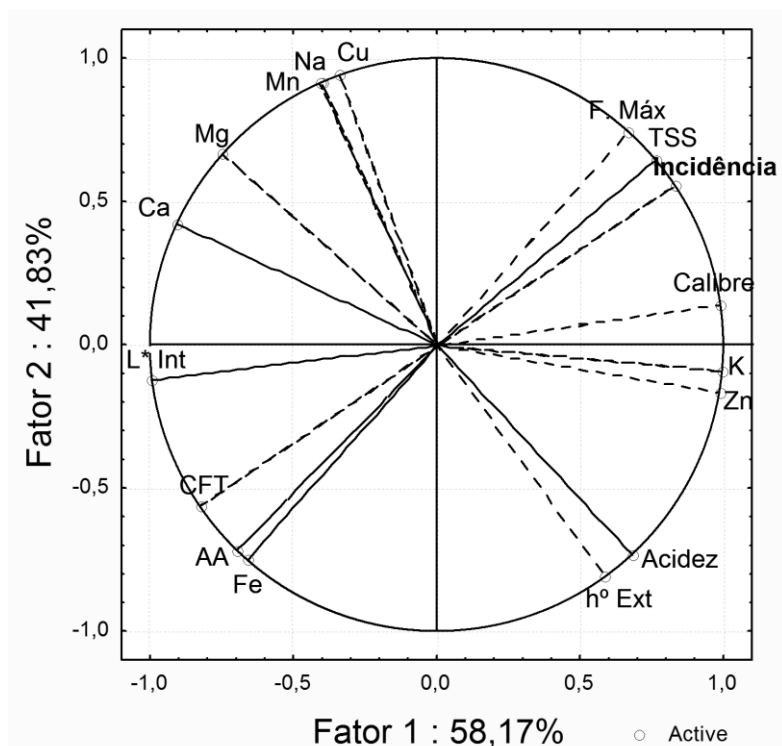


Figura 14 - Projeção espacial da ordenação dos vetores dos atributos analisados nas amostras (A, B e C) de pera 'Rocha', no plano definido pelas duas primeiras componentes principais.

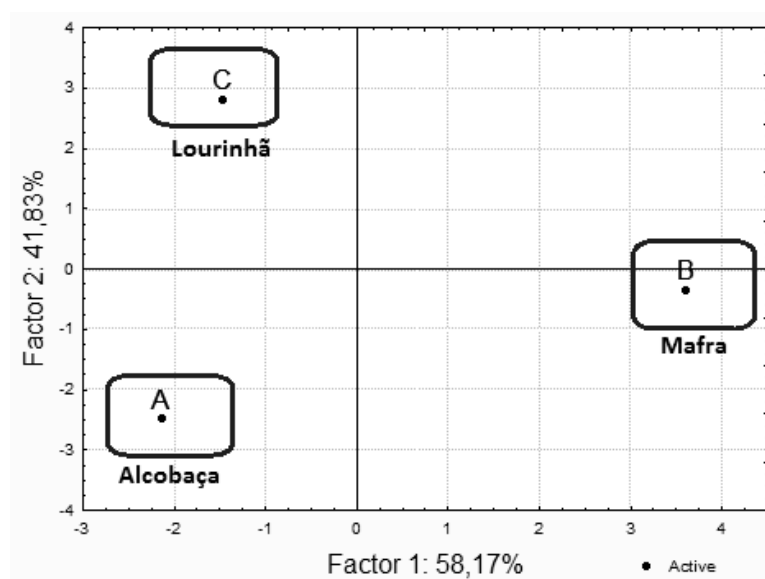


Figura 15 – Projeção espacial das amostras (A, B e C) de pera 'Rocha' no plano definido pelas duas primeiras componentes principais

Analisando o gráfico da projeção espacial dos vetores das variáveis (círculo unitário) e da projeção espacial das amostras (plano fatorial), podemos tentar inferir uma interpretação para as componentes principais.

A componente principal 1 – CP1 (Fator 1) é responsável pela modelação de 58,17% da variância da matriz de dados e, é nesta componente que se projeta com significado estatístico a variável incidência, que reflete a questão central, isto é, a suscetibilidade dos frutos aos escurecimentos internos. A CP1 é assim explicada pelas variáveis: incidência a EI, TSS, calibre, luminosidade da polpa ( $L^*_{Int}$ ), CFT, teores de potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg) e zinco (Zn). Por outro lado, a CP2 explica 41,83% da variabilidade e inclui as variáveis: AA, acidez, tonalidade do epicarpo ( $h^0_{Ext}$ ), firmeza (F. máx.) e pelos teores minerais de ferro (Fe), manganês (Mn) e sódio (Na).

É interessante notar que os atributos: AA, CFT, Fe e  $L^*_{int}$  e tonalidade interna ( $h^0_{Int}$ ) variam em sentido contrário relativamente à incidência a EI, refletindo que frutos mais vulneráveis a desordens de escurecimento interno são aqueles que apresentam menores teores de ácido ascórbico, de CFT (capacidade antioxidante) e, de ferro.

A correlação direta com a luminosidade interna é evidente uma vez que as desordens de escurecimento interno implicam o acastanhamento dos tecidos afetados, contribuindo assim para a diminuição dos valores de  $L^*$ .

A relação de EI com os atributos que expressam indiretamente o estado de maturação dos frutos – teor de sólidos solúveis e firmeza é, positiva e significativa. A co-linearidade do TSS com o EI poderia traduzir que frutos em estado de maturação pós-colheita mais avançados seriam mais suscetíveis a desordens internas. Por outro lado, a correlação da firmeza com o EI traduziria o sentido inverso, isto é, frutos mais firmes, em estado de maturação mais incipiente seriam mais vulneráveis aos escurecimentos internos. Neste sentido, a suscetibilidade dos frutos face ao respetivo estado de maturação é inconclusivo.

As variáveis: ferro (Fe), cálcio (Ca) e magnésio (Mg), com projeção na CP1 (fator 1), surgem com sinais contrários à incidência EI, refletindo que frutos mais vulneráveis a desordens de escurecimento interno são aqueles que apresentam teores mais baixos destes minerais. Em sentido inverso, os teores de potássio (K) e zinco (Zn) apresentam-se correlacionados positivamente com a variável incidência EI, sugerindo, neste caso, que nos frutos o teor elevado destes minerais vulnerabiliza estas desordens internas. A relação do EI com o teor em minerais, aponta para a importância das condições edafoclimáticas e /ou da nutrição mineral ao nível da condução dos pomares na qualidade intrínseca dos frutos com influência na resistência a desordens de escurecimento interno.

Cada um dos nutrientes minerais exerce, em associação ou isoladamente, funções específicas que influenciam o comportamento das plantas tais como o crescimento, produção de frutos e respetiva qualidade (ex. longevidade, resistência a pragas e doenças). Atenção especial tem sido dada aos teores de Ca, Mg e K pois são nutrientes bastante influentes na qualidade e ocorrência de desordens de escurecimento interno nos frutos (Ferguson *et al.*, 1999).

De acordo com estudos previamente realizados, diversos autores associam nutrientes como o cálcio e o potássio com a ocorrência de desordens de escurecimento interno (Silveira *et al.*, 2012; Corrêa *et al.*, 2012; Amarante *et al.*, 2013). Estes minerais desempenham importantes funções na integridade das membranas celulares (Freitas *et al.*, 2010; Amarante *et al.*, 2013). Tal como se referiu anteriormente frutos com menores teores em cálcio e maiores teores em potássio podem ser mais suscetíveis a desordens de escurecimento interno. Os teores de Mg podem, igualmente, ser relacionados com o escurecimento de polpa, com o mesmo sentido de variação apresentado para o potássio. No entanto, os resultados desta análise não evidenciaram esta relação.

Outra proposta de análise interpretativa faz-se pela sobreposição do círculo unitário de projeção sobre o plano fatorial de projeção espacial das amostras. Desta forma é possível identificar visualmente quais as variáveis que estão relacionadas com os casos em estudo (quintas). Por outro lado, as variáveis muito próximas no círculo unitário possuem uma maior correlação, em oposição às variáveis que estão mais afastadas.

Na Figura 15, a projeção das amostras (A, B e C) no plano definido pelas duas componentes principais (PC1, PC2) evidencia uma clara separação das mesmas de acordo com a localização geográfica e a incidência a desordens de escurecimento interno. Assim, os frutos com origem em Alcobaça e de maior resistência às desordens internas encontram-se representados no 3º quadrante (amostra A), os frutos provenientes da Lourinhã numa posição intermédia em termos de vulnerabilidade projetam-se no 2º quadrante (amostra C) e, por último os frutos oriundos de Mafra, com a maior vulnerabilidade ao EI, projetam-se no 4º quadrante (amostra B).

A amostra A (Quinta Amaros - Alcobaça) possui maior influência das variáveis localizadas no 3º quadrante (AA, CFT e Fe) por neste estar projetada. Por outro lado não é influenciada pelas variáveis do 1º quadrante (TSS, F. máxima, calibre e incidência). Este fato reforça a importância das condições edafoclimáticas na suscetibilidade dos frutos a desordens de escurecimento interno.

## **4.2 Distribuição espacial do ácido ascórbico e dos compostos fenólicos totais na polpa dos frutos**

### **4.2.1 Objetivo e delineamento experimental**

Este ensaio teve por objetivo analisar as relações entre a incidência de desordens de escurecimento interno na pera 'Rocha' e as concentrações de ácido ascórbico (AA) e de compostos fenólicos totais (CFT), em pera 'Rocha' com distintas proveniências geográficas e distintas suscetibilidades a EI.

Na hipótese formulada por Veltman *et al.* (1999) e Zerbini *et al.* (2002) afirma-se que quanto maior a concentração de AA menor é a suscetibilidade do fruto a EI e, que os sintomas

desenvolvem-se durante a armazenagem do fruto quando o respetivo teor diminui para além de uma determinada concentração – hipótese do limiar de concentração de AA.

Para o efeito foram avaliados os teores de AA e CFT em frutos com duas proveniências geográficas: Alcobaça – amostra A e, Mafra – amostra B (previamente armazenados em condições de ACD, *cf.* Anexo I), com marcadas diferenças de EI (0% e 43%, respetivamente). Estas determinações foram efetuadas em dois tipos de tecidos da polpa: tecidos próximos do caroço (Int / centrais) e tecidos próximos do epicarpo (Ext / periféricos). No caso da amostra B, foi ainda efetuada a mesma quantificação em de frutos com escurecimento interno visível.

Os frutos foram cortados transversalmente tendo sido separados os tecidos exteriores (polpa periférica, sem casca) dos tecidos da zona central (diâmetro  $\approx$  1cm), tal como é representado na Figura 16.

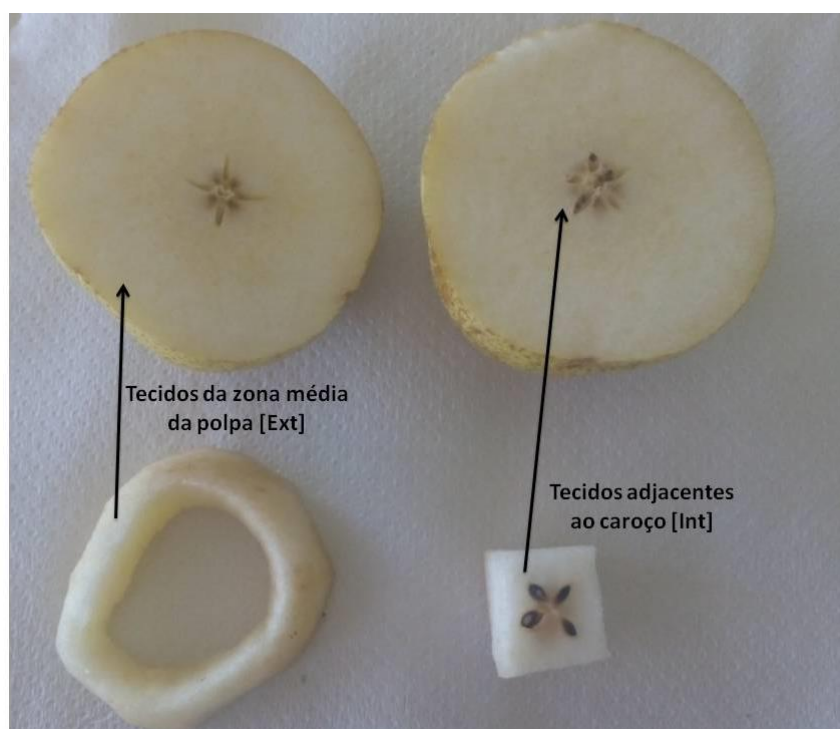


Figura 16 – Esquema de corte dos frutos, na determinação do teor de AA e CFT em diferentes tecidos.

Foram assim constituídos 4 tipo de amostras: A\_int; A\_ext; B\_int; B\_ext. Para a amostra B e como só neste caso existiam frutos com manifestação de escurecimentos internos foi constituída uma amostra suplementar. Assim e, após a identificação visual de escurecimentos internos nos frutos, os mesmos foram separados em isentos de escurecimentos internos visíveis (Sem EI) daqueles que apresentaram danos visíveis (Com EI), tal como é esquematizado na Figura 17.

Os valores de AA (mg/100 g PF) reportam à média de 6 determinações por amostra (triplicados de extração com duas injeções cada). O teor médio em CFT (mg de equivalentes de ácido clorogénico por 100 g PF) corresponde à média de 6 determinações (2 extrações com 3 leituras espectrofotométricas cada).

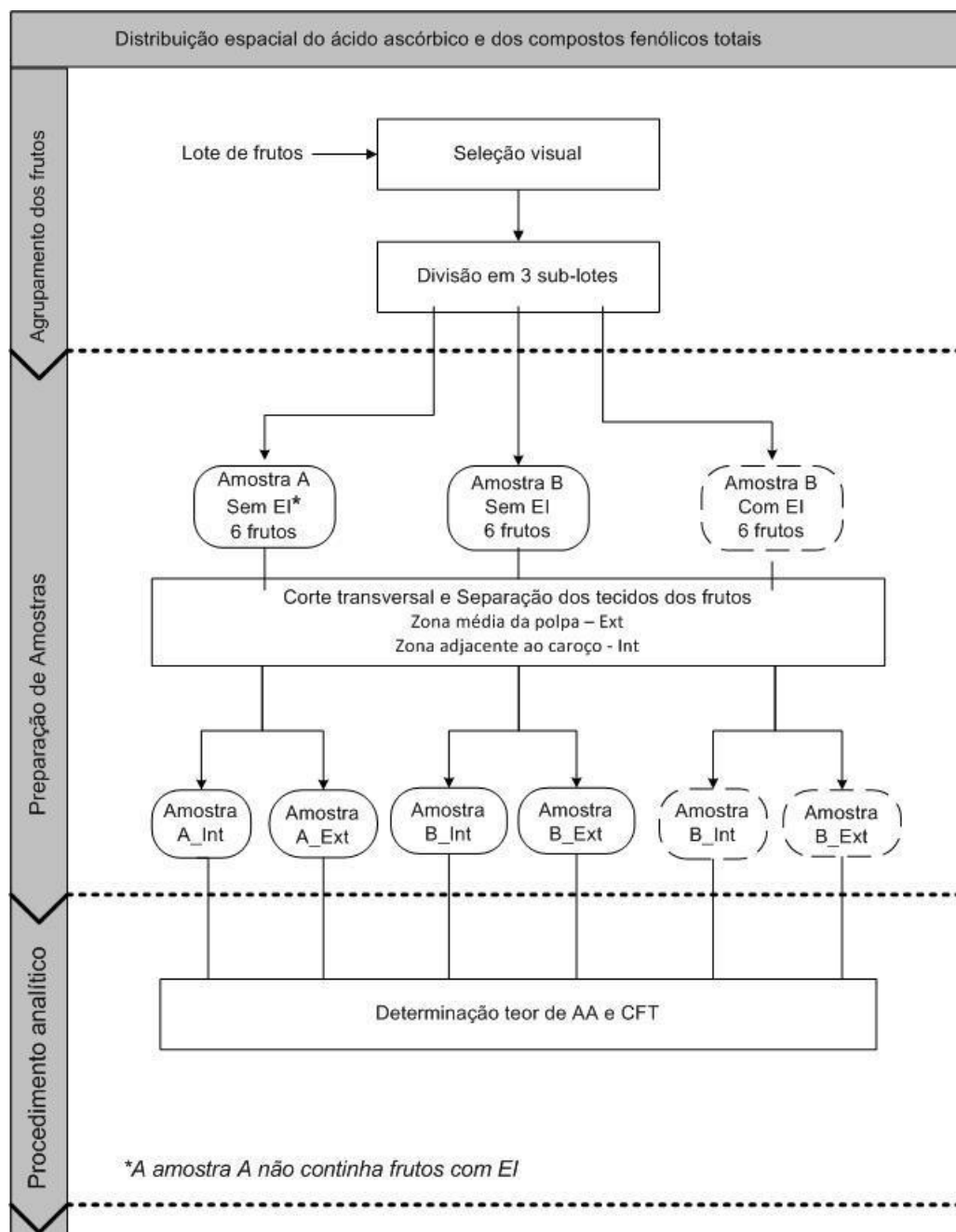


Figura 17 - Diagrama de delineamento experimental do ensaio II.

## 4.2.2 Resultados e discussão

### Ácido Ascórbico e Compostos Fenólicos Totais

Os teores de ácido ascórbico (AA) e de compostos fenólicos totais (CFT) das amostras de pera 'Rocha', em função da origem geográfica (Alcobaça (A), Mafra (B)) e, da localização dos tecidos na polpa (zona central - Int, zona média - Ext), são apresentados nas Figuras 18 e 19.

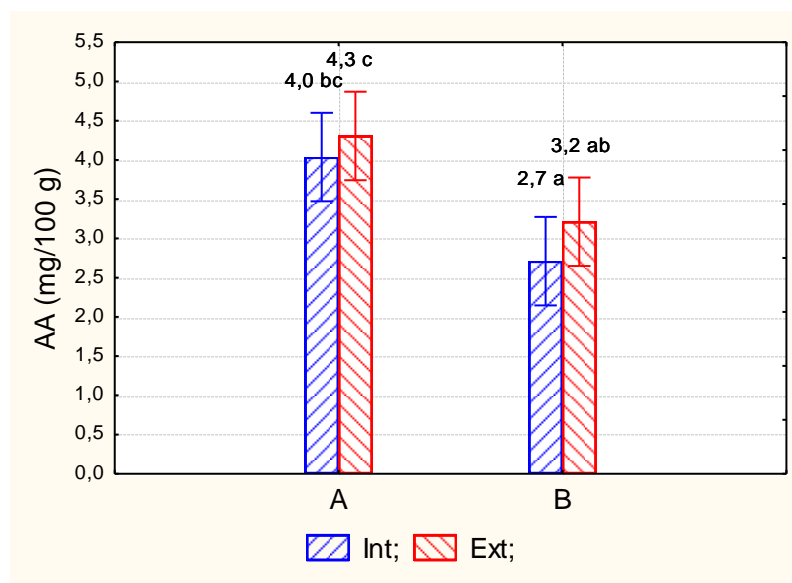


Figura 18 – Valores médios de AA (mg / 100 g PF) relativos às amostras (A\_int; A\_ext; B\_int; B\_ext) de pera 'Rocha' com distintas origens geográficas (Alcobaça (A), Mafra (B)), em zonas distintas da polpa (int, ext). Barras verticais correspondem ao intervalo de confiança a 95%. Valores médios com letras diferentes representam diferenças significativas a  $p=0,05$  (Teste de Tukey).

O teor de AA é exclusivamente influenciado ( $p<0,05$ ) pela origem geográfica dos frutos (Figura 18), constatando-se, mais uma vez (cf. ponto 4.1), que a pera 'Rocha' proveniente de Alcobaça possui teores superiores ( $p<0,05$ ) face aos de Mafra.

Independentemente do tipo de amostra, os valores de AA nos tecidos da zona média da polpa (Ext) foram superiores aos avaliados nos tecidos adjacentes ao caroço (Int). Esta tendência ( $p>0,05$ ) expressa uma distribuição de concentrações, tal como tem sido caracterizada noutros estudos (Veltman *et al.*, 1999)

A superioridade do teor em AA nas amostras A, em ca de 30%, relativamente às amostras B, corrobora a tese que relaciona o teor de AA à prevenção do escurecimento interno, em pera (Lentheric *et al.*, 1999, Veltman *et al.*, 1999), tendo em conta que nos frutos da amostra A (Alcobaça) nunca foi detetada a presença de sintomas (0% de EI) em comparação com os

frutos provenientes de Mafra cuja incidência de EI foi de 43% (sabendo que ambos foram armazenados sob nas mesmas condições de AC).

As condições de armazenagem em AC são responsáveis por alterações na função mitocondrial e na capacidade redox dos tecidos em que a acumulação de compostos redutores (ex. NADPH) tem como consequência a produção de espécies reativas de oxigénio (ROS – reactive oxygen species). A atividade de enzimas antioxidantes, tais como, a superóxido dismutase (SOD), a ascorbato peroxidase (APX) e a glutatona redutase (GR) pode por isso aumentar em resposta a condições de AC não otimizadas (Pinto *et al.* 2001).

O desequilíbrio entre o consumo e a regeneração de AA e, o aumento da remoção não enzimática de radicais livres pelo AA tem como resultado a diminuição da respetiva concentração. Nesta situação, inviabiliza-se a possibilidade de prevenção de danos oxidativos, tendo como resultado a peroxidação das membranas lipídicas e a consequente descompartmentalização celular. Com a rutura celular viabiliza-se o contato entre a enzima polifenoloxidase (PPO) e respetivos substratos fenólicos, cuja atividade é responsável pelo escurecimento dos tecidos.

A hipótese desenvolvida por Veltman *et al.* (1999) e Zerbini *et al.* (2002) refere que quanto maior for a concentração de AA menor é a suscetibilidade da pera face a esta desordem e, que o mesmo tem lugar durante a armazenagem quando esta diminuição ultrapassa uma determinada concentração – hipótese do limiar de concentração de AA.

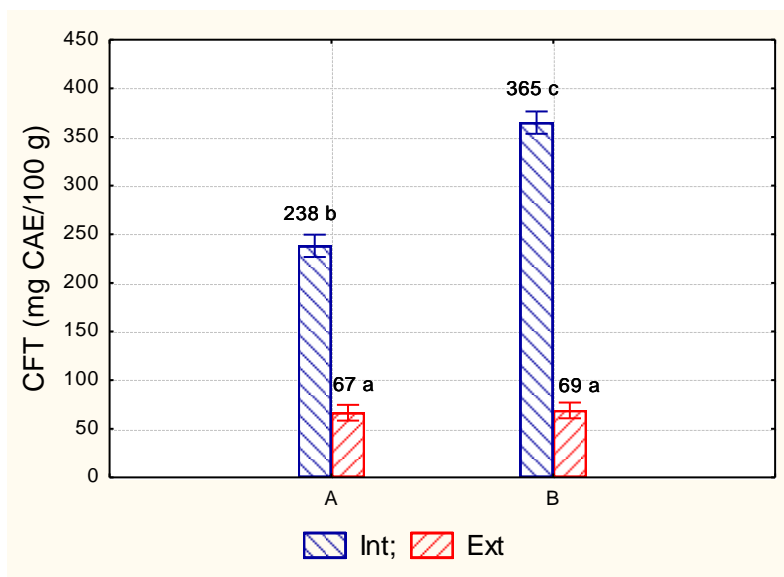


Figura 19 – Valores médios de CFT (mg EAC / 100 g PF) relativos às amostras (A\_int; A\_ext; B\_int; B\_ext) de pera 'Rocha' com distintas origens geográficas (Alcobaça (A), Mafra (B)), em zonas distintas da polpa (int, ext). Barras verticais correspondem ao intervalo de confiança a 95%. Valores médios com letras diferentes representam diferenças significativas a  $p=0,05$  (Teste Tukey).

Da análise da Figura 19, verifica-se que o teor em CFT mostrou ser dependente da localização dos tecidos na polpa, tendo-se verificado valores significativamente superiores nos tecidos adjacentes ao caroço (Int) face aos tecidos da zona média da polpa (Ext), independentemente da origem geográfica dos frutos (Alcobaça, Mafra). Esta distribuição de concentrações revela-se oposta face à que foi caracterizada para o ácido ascórbico.

A influência da origem dos frutos só se revelou com significado estatístico ( $p < 0,05$ ) para os níveis de CFT avaliados na zona interna da polpa, tendo nesta situação sido contabilizados valores superiores ( $p < 0,05$ ) para a amostra B (frutos de Mafra).

Nas Figuras 20 e 21 são apresentados os resultados dos teores de AA e de CFT, relativos aos frutos de Mafra (43% de EI), com e sem manifestação de escurecimento interno visível (Com EI, Sem EI), nas duas zonas da polpa (Int, Ext).

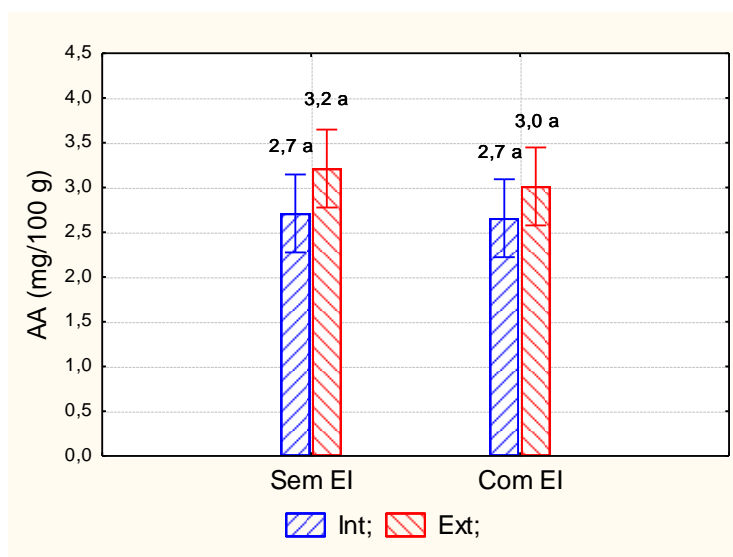


Figura 20 – Valores médios de AA (mg / 100 g PF) relativos às amostras do tipo B, em zonas distintas da polpa (int, ext) e a partir de frutos com e sem danos de escurecimento interno visível (Com EI, Sem EI). Barras verticais correspondem ao intervalo de confiança a 95%. Valores médios com letras diferentes representam diferenças significativas a  $p = 0,05$  (Teste de Tukey).



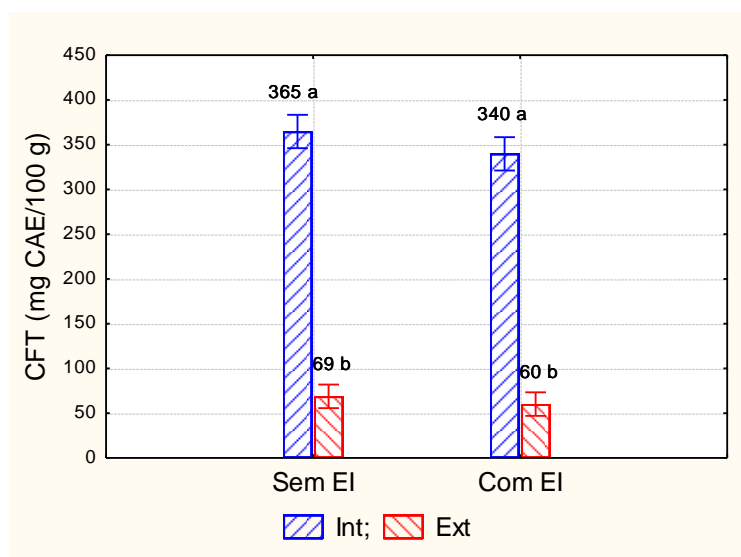


Figura 21 – Valores médios de CFT (mg / 100 g PF) relativos às amostras do tipo B, em zonas distintas da polpa (int, ext) e a partir de frutos com e sem danos de escurecimento interno visível (Com EI, Sem EI). Barras verticais correspondem ao intervalo de confiança a 95%. Valores médios com letras diferentes representam diferenças significativas a  $p=0,05$  (Teste de Tukey).

Da Figura 20, verifica-se que o teor de AA não apresentou variações quer em função da localização do tecido analisado (tal como anteriormente constatado) quer em função do estado do fruto (com e sem danos).

Da Figura 21, verifica-se que o teor de CFT não apresentou variações significativas em função do estado do fruto, no entanto, verificaram-se variações significativas ( $p<0,05$ ) em função da localização do tecido analisado. Assim, nos tecidos próximos do caroço os teores de CFT foram superiores, em cerca de cinco vezes, face aos tecidos da zona média da polpa.

Este padrão de distribuição traduz na zona problemática uma capacidade antioxidante elevada, tendo em conta que o teor fenólico constituiu o principal contributo para a capacidade antioxidante de pera ‘Rocha’ (Galvis-Sánchez *et al.*, 2003). A reforçar esta hipótese, assinala-se a comparação do teor fenólico entre as amostras A e B (Figura 19), na qual se verificou a superioridade do teor de CFT nos tecidos próximos do caroço (Int) na amostra B (43% de EI) face aos da amostra A (0% de EI).

Nos frutos B, com e sem danos, a verificação do mesmo perfil de distribuição, pode ser justificada pela elevada incidência ao EI caracterizada neste lote de frutos (43% de EI).

Nos frutos muito suscetíveis ao EI, a síntese de CFT, em particular nos tecidos onde preferencialmente se manifestam os danos, pode ser interpretado como uma resposta de defesa da planta ao “stress” oxidativo que se gera neste tipo de desordem fisiológica.

Nos frutos da amostra B (43% de EI) a correspondência entre as zonas lesionadas (Int) com a confirmação da presença de elevados teores fenólicos (>350 mg EAC/100 g) e valores de AA baixos (<3 mg/100 g) confirma que a capacidade antioxidante do fruto é importante na manifestação deste tipo de desordem.

Nos frutos de elevada incidência ao EI (B), o fato de nas zonas lesionada (Int) terem sido contabilizados teores de CFT significativamente ( $p < 0,05$ ) superiores face à zona média da polpa (Ext), sem entre as mesmas, se ter verificado diferenças ( $p > 0,05$ ) no teor de AA, parece sugerir que a capacidade de resposta dos tecidos está preferencialmente na dependência de compostos de natureza fenólica. A contabilização de teores de AA ( $p < 0,05$ ) mais baixos nos tecidos da zona central de frutos com EI pode ser justificada pelo respetivo papel na remoção não enzimática de radicais livres. No entanto, é importante referir que é altamente recomendável a manutenção de valores elevados de ácido ascórbico durante a armazenagem dos frutos pós-colheita, com benefícios tanto para os produtores como para os consumidores.

### **4.3 Potencial de amadurecimento à temperatura ambiente**

#### **4.3.1 Objetivo e delineamento experimental**

Este ensaio teve por objetivo avaliar a qualidade pós-colheita da pera 'Rocha', em condições de simulação da comercialização, isto é, verificar a capacidade de amadurecimento e desenvolvimento das características organoléticas expectáveis para consumo, de frutos previamente armazenados em condições de ACD de diferentes origens geográficas.

Neste sentido, os frutos de pera 'Rocha' oriundos de 3 quintas (Amaros (id: A), Baptista (id: B) e Quinta do Rol (id: C)) de diferentes localizações geográficas (Alcobaça (A), Mafra (B), Lourinhã (C)) previamente armazenados em condições de ACD (cf. Anexo I) e posteriormente mantidos, ca de 1 mês, em condições de refrigeração (ca 0°C), foram transferidos para condições de temperatura ambiente (ca 20°C), durante 8 dias. Neste período foram avaliados os seguintes atributos da qualidade: Cor CIELab, firmeza, pH, acidez titulável e TSS em 4 momentos: 0, 4, 6 e 8 dias de condicionamento.

Durante o período de condicionamento efetuaram-se registos diários da temperatura da sala (Anexo IV).

A partir de três lotes homogêneos selecionados constituíram-se, três tipos de amostras (24 frutos cada), de acordo com a localização geográfica A, B e C. As amostras foram acondicionadas em sacos de plástico e analisados nos dias 0, 4, 6 e 8 de armazenagem.

O procedimento analítico do ensaio III encontra-se esquematizado na Figura 22.

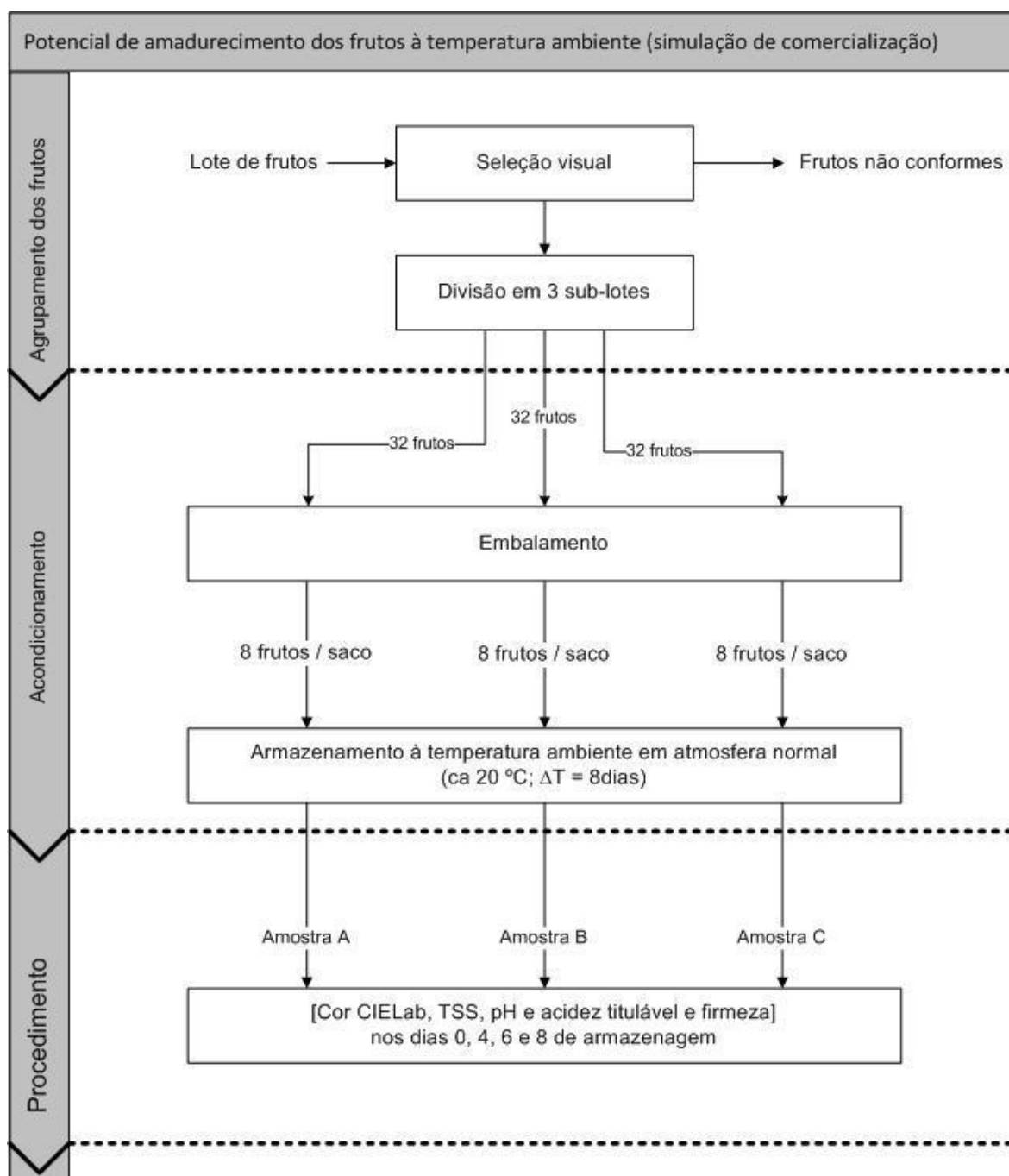


Figura 22 – Diagrama de delineamento experimental para avaliação do potencial de amadurecimento dos frutos à temperatura ambiente.

### 4.3.2 Resultados e discussão

#### Registos fotográficos e Cor CIELab

Os registos fotográficos e os resultados dos parâmetros Cor CIELab são apresentados nas Tabelas constantes do Anexo IV.

Na Figura 23 e 24 são apresentados, respetivamente, os valores do índice de escurecimento (WI) da polpa e os valores da tonalidade ( $h^0$ ) do epicarpo relativos às amostras analisadas durante o período de condicionamento à temperatura ambiente (8 dias, *ca* 20°C)

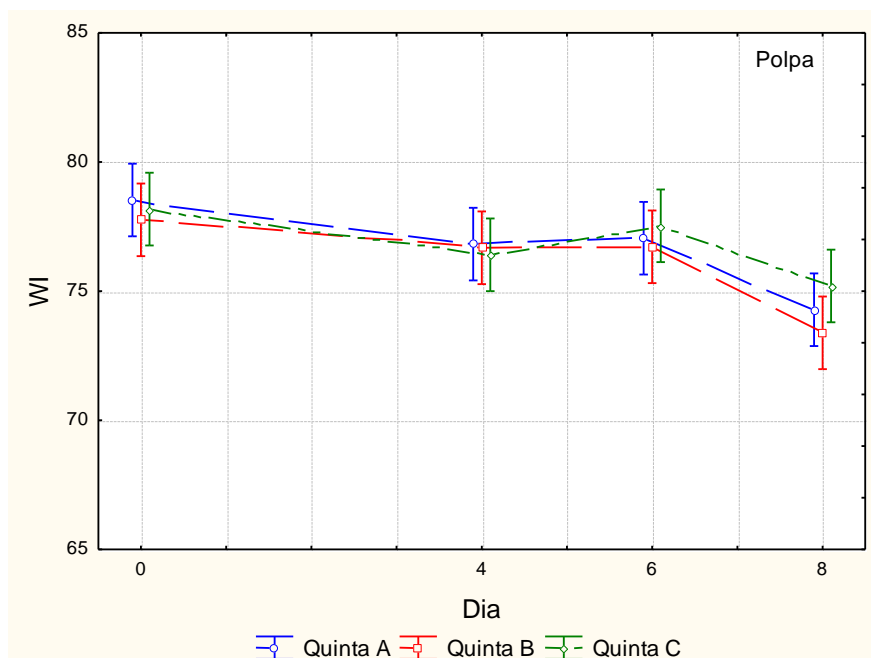


Figura 23 – Valores médios de índice de escurecimento (WI) da polpa dos frutos, armazenados à temperatura ambiente, e analisados em 4 momentos distintos (D0, D4, D6 e D8). Barras verticais correspondem ao intervalo de confiança a 95%,

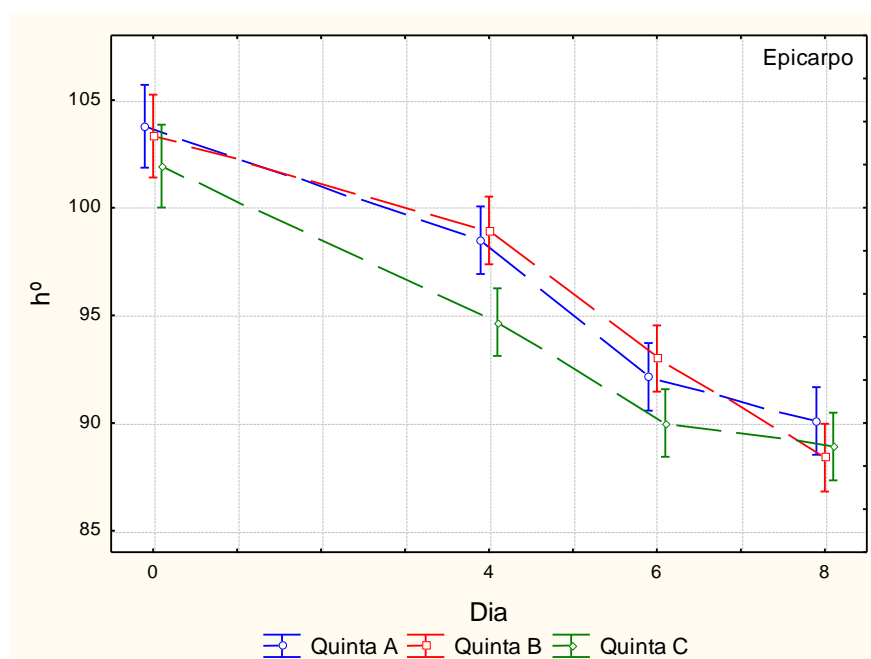


Figura 24 – Valores médios de tonalidade (hue -  $h^0$ ) do epicarpo dos frutos, nos dias

0, 4, 6 e 8 de armazenagem. Barras verticais correspondem ao intervalo de confiança a 95%,

Os valores médios de WI apresentados na Figura 24 mostram variações não significativas ( $p > 0,05$ ) até ao 6º dia, declarando a inalteração dos níveis de escurecimento para todas as amostras. No último intervalo testado verificou-se uma ligeira tendência escurecimento ( $p > 0,05$ ) dos frutos, independentemente da respetiva origem. No entanto, esta variação foi significativa nos casos das amostras A e B quando comparados com os registos iniciais (dia 0), variações de ca de 5%.

A variação da tonalidade  $h^0$  do epicarpo ao longo do período de condicionamento (Fig. 24) declara para todas as amostras uma diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) até ao 6º dia, com decréscimo médio de ca 14% face ao dia 0) com manutenção dos registos médios no restante período. Esta variação corresponde a uma alteração da tonalidade verde para amarelo, tal como é característica do processo de amadurecimento pós-colheita da pera “Rocha”.

A degradação enzimática das clorofilas pelas clorofilases, estimulada pela ação do etileno (Luchsinger e Walsh (1993) e, a síntese de carotenoides e outros pigmentos de cor amarela (Lelièvre *et al.*, 1997) estão na base da referida alteração da tonalidade de frutos fisiologicamente desenvolvidos.

Até ao 4º dia, a taxa de diminuição dos valores de  $h^0$  é superior na amostra C face às amostras A e B, apresentando a primeira valores de  $h^0$  inferiores ( $p < 0,05$ ) o que indicia para estes frutos um amadurecimento mais rápido.

Este comportamento é concordante com os registos fotográficos, nos quais os frutos, independentemente da origem, tendem a amarelecer com o período de condicionamento à temperatura ambiente (Anexo IV). Esta evolução foi crítica ao 6º dia, para todas as amostras, na medida em que a perceção da cor amarela é a partir desta data (inclusive) indicativa de amadurecimento excessivo. A diferença significativa avaliada no parâmetro  $h^0$  entre a amostra C e, as amostras A e B não teve tradução visual, isto é, a alteração correspondente a 4 unidades de variação.

### **Firmeza**

Na Figura 25 são apresentados os valores de firmeza (pico de força máxima; N) relativos às amostras testadas durante o período de acondicionamento à temperatura ambiente (8 dias, ca 20°C).

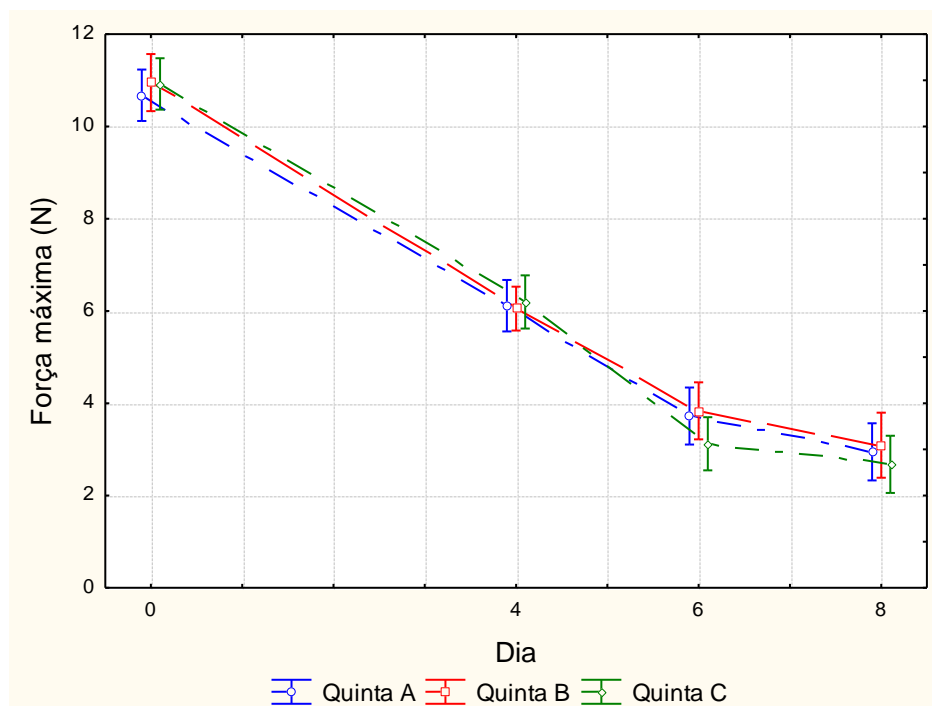


Figura 25 - Valores médios de força máxima registada nos dias 0, 4, 6 e 8 de armazenagem. Barras verticais correspondem ao intervalo de confiança a 95%,

Verifica-se que ocorreu uma diminuição significativa nos valores médios de firmeza (Fig. 25) de todas as amostras até ao 6º dia, sem variações posteriores. A perda de firmeza face ao dia 0 de ca 73% traduz um excessivo amolecimento dos frutos.

A evolução dos valores de firmeza não foi influenciada pela proveniência geográfica/qualidade intrínseca dos frutos uma vez que não se verificaram diferenças significativas na comparação entre amostras em todos os dias avaliados.

Através de prova sensorial informal todos os frutos, independentemente da origem, apresentaram uma textura excessivamente branda a partir do 4º dia e em consequência inadequados para a comercialização em natureza.

As peras necessitam de um período de tempo à temperatura ambiente para completar o amadurecimento, caracterizado pela perda de firmeza dos tecidos. Segundo Seibert *et al* (2000), a diminuição da firmeza da polpa é atribuída à dissociação das paredes celulares, com diminuição do grau de polimerização de ácidos urónicos acompanhado pelo aumento dos teores de pectinas solúveis.

### Acidez titulável, pH e TSS

Os resultados da acidez titulável (AT) expressos em concentração de equivalentes de ácido málico por litro, são apresentados na Figura 26.

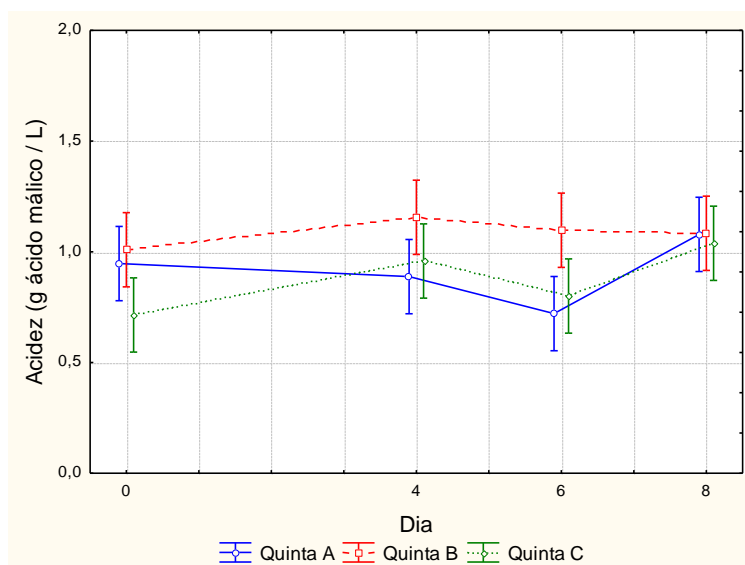


Figura 26 – Valores médios de acidez (g ácido málico/L) dos frutos, dias 0, 4, 6 e 8 de armazenagem. Barras verticais correspondem ao intervalo de confiança a 95%,

Os valores médios de AT apresentados (Fig. 26) mostram variações não significativas ( $p>0,05$ ) entre amostras, nem denotaram variações com o período de acondicionamento.

O acondicionamento à temperatura ambiente não alterou os valores de acidez titulável dos frutos, independentemente da origem geográfica e a gama de valores apresenta valores similares à gama de variação avaliada ( $1,1$  a  $1,3 \text{ g L}^{-1}$ ) em frutos da mesma variedade após armazenagem prolongada quer em condições de AC quer refrigerada à atmosfera normal (Carvalho, A, 2011).

Na Tabela 6 são apresentados os resultados de pH e do teor de sólidos solúveis (TSS), respetivamente, relativos às amostras em avaliação durante a durante o período de acondicionamento à temperatura ambiente (8 dias, ca  $20^{\circ}\text{C}$ ).

Tabela 6 - Valores médios de pH e TSS dos frutos, nos dias 0, 4, 6 e 8 de armazenagem.

Dia	Id_am	pH	TSS
0	A	4,9 <sup>a</sup> ±0,2	10,7 <sup>a</sup> ±0,5
	B	4,9 <sup>a</sup> ±0,3	11,1 <sup>a</sup> ±0,6
	C	4,7 <sup>a</sup> ±0,3	11,0 <sup>a</sup> ±1,4
4	A	4,7 <sup>a</sup> ±0,0	10,9 <sup>a</sup> ±0,1
	B	4,7 <sup>a</sup> ±0,0	12,0 <sup>a</sup> ±0,3
	C	4,7 <sup>a</sup> ±0,1	12,7 <sup>a</sup> ±0,4
6	A	4,6 <sup>a</sup> ±0,0	11,5 <sup>a</sup> ±0,4
	B	4,7 <sup>a</sup> ±0,1	12,0 <sup>a</sup> ±0,1
	C	4,5 <sup>a</sup> ±0,1	12,7 <sup>a</sup> ±0,0
8	A	4,5 <sup>a</sup> ±0,0	11,9 <sup>a</sup> ±0,1
	B	4,6 <sup>a</sup> ±0,0	12,4 <sup>a</sup> ±0,6
	C	4,4 <sup>a</sup> ±0,0	11,5 <sup>a</sup> ±0,3

As amostras não denotaram variações significativas ( $p>0,05$ ) nos valores de pH ( $4,7 \pm 0,3$ ) em função do tempo de armazenagem. Apesar de se verificar uma tendência decrescente, com uma variação média de *ca* 0,4 unidades face ao dia 0, esta diferença tem um significado fisiológico pouco expressivo para os frutos.

Não se verificaram variações significativas de TSS entre amostras e em função do período de acondicionamento. No entanto, verificou-se uma tendência de aumento de TSS, com exceção da amostra C no último intervalo testado (decréscimo de cerca de 1ºBrix).

Vangdal (1982) afirma que o sabor das peras é fortemente influenciado pelo conteúdo de sólidos solúveis totais da fruta, o que encontra concordância com o aumento da relação TSS/AT

Tendo em conta que a pera ‘Rocha’ apresenta baixa acidez, o sabor é fortemente influenciado pelo conteúdo de sólidos solúveis totais presentes no fruto (Vangdal, 1982) é importante assinalar que as amostras alcançaram o valor de TSS mínimo de 11,5ºBrix (segundo as especificações comerciais para este fruto (TriPortugal) ao 6º dia de acondicionamento à temperatura ambiente.

#### 4.4 Aptidão para processamento mínimo

##### 4.4.1 Objetivo e delineamento experimental

Este ensaio teve como objetivo avaliar a aptidão dos frutos para processamento mínimo, durante a armazenagem, em função da qualidade inicial da matéria-prima – frutos de pera ‘Rocha’ de distintas origens geográficas.



Para cumprir o objetivo foram avaliados atributos da qualidade físico-química, durante 7 dias (5 °C), em frutos minimamente processados submetidos às seguintes operações: descasque, corte em quartos e embalagem em atmosfera modificada passiva.

A partir de três lotes homogêneos selecionados (ver fig. 27), foram preparadas três tipos de amostras (12 frutos cada) de acordo com a localização geográfica dos frutos (Alcobaça - A, Mafra - B e Lourinhã - C). Os frutos foram minimamente processados e armazenados durante 7 dias à temperatura de 5 °C. Nos dias 0, 2 e 7 de armazenagem foram avaliados os seguintes atributos: cor CIELab (superfície descascada (face externa) e superfície cortada (face interna)), pH, teor de sólidos solúveis, conteúdo fenólico total e, efetuadas análise sensorial informal e registos fotográficos.

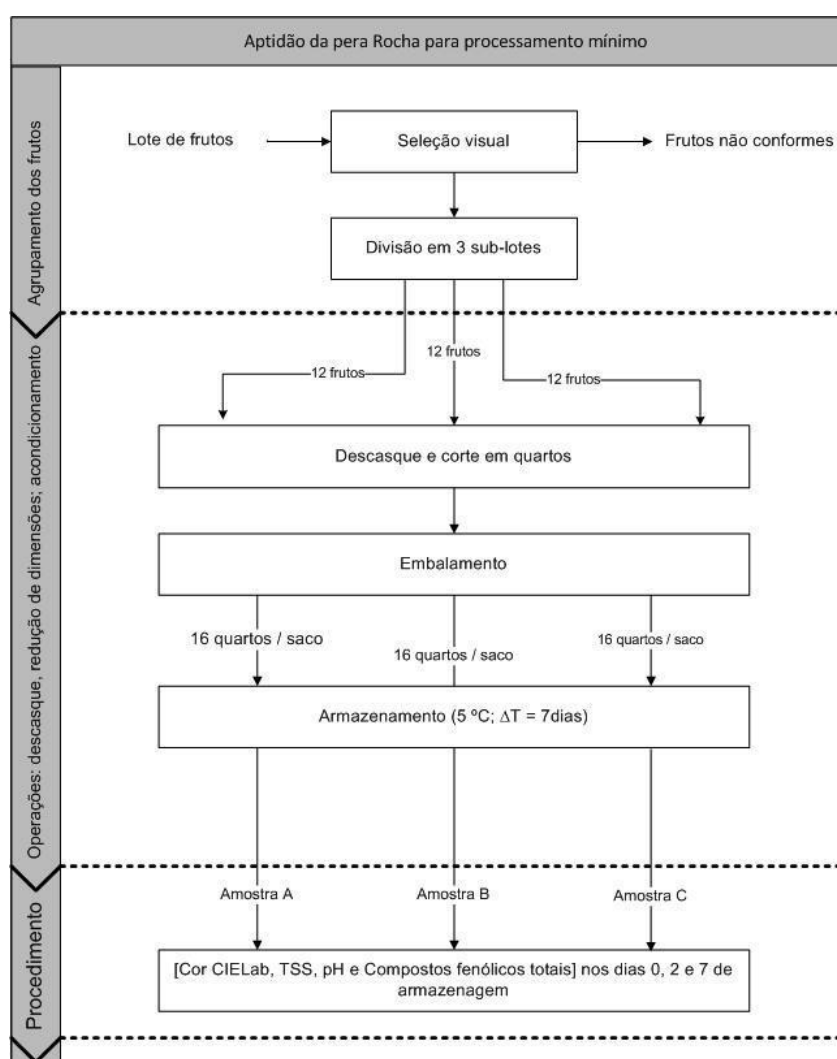


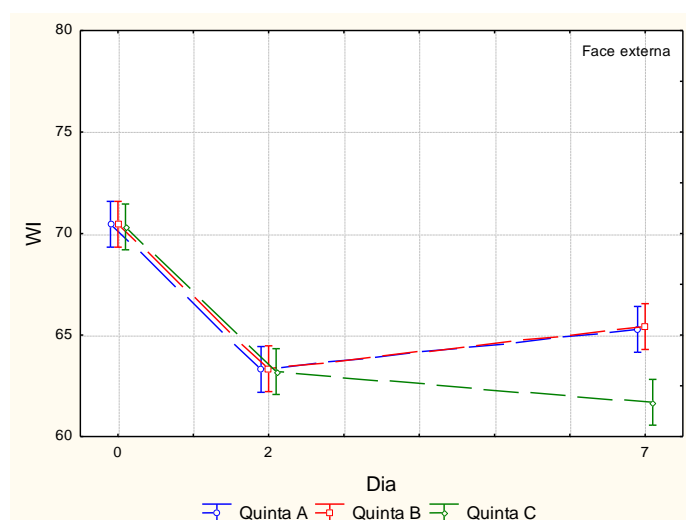
Figura 27 - Diagrama de delineamento experimental e tratamento de resultados.

#### 4.4.2 Resultados e discussão

##### Cor CIELab e apreciação sensorial do aspeto visual

Nas Figuras 28a e 28b são apresentados respetivamente os resultados do índice de escurecimento WI das superfícies descascada e, cortada, de quartos de pera relativos às amostras (A, B e C) preparados a partir de frutos com diferentes origens geográficas, respetivamente, Alcobaça, Mafra e Lourinhã.

a) Superfície descascada dos quartos de pera 'Rocha'



b) Superfície cortada dos quartos de pera 'Rocha'

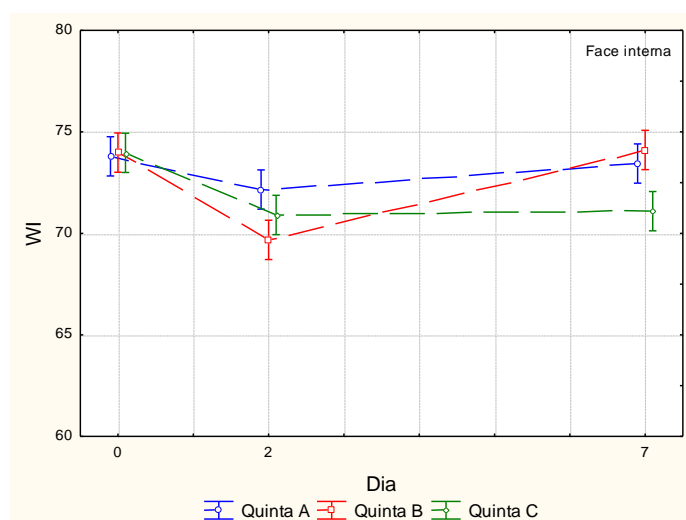


Figura 28 – Variação do índice de escurecimento (WI) das amostras de pera 'Rocha' minimamente processada (A, B e C), ao longo da armazenagem (7 dias, 5°C). a) Superfície descascada; b) Superfície cortada. Barras verticais correspondem ao intervalo de confiança a 95%.

Na Figura 28, as variações de WI durante a armazenagem (7 dias, 5 °C) assinalam grandes diferenças de escurecimento entre as duas zonas avaliadas, superfícies descascadas (F. externa) e cortadas (F. interna). Assim nas superfícies descascadas (28a) a gama de variação de WI (ca de 63 a 71) traduz níveis de escurecimento mais acentuados dos que foram avaliados nas superfícies cortadas (28b) a variar de 70 a 74. Esta diferença prende-se com a natureza bioquímica dos tecidos que compõem as duas zonas e que manifestam diferentes suscetibilidades ao escurecimento. As superfícies descascadas (tecidos subjacentes ao epicarpo) apresentam níveis de atividade enzimática da PPO e teor fenólico superiores relativamente aos tecidos do mesocarpo do fruto (Abreu, 2010).

A diminuição de WI nas superfícies descascadas, no 1º intervalo testado (0-2 dias) foi significativa ( $p<0,05$ ), independentemente das amostras. No entanto no mesmo período, os níveis de escurecimento das superfícies cortadas só foram significativos ( $p<0,05$ ) no caso da amostra B.

Os registos fotográficos das amostras (dias 0, 2 e 7) (Tabela constante no Anexo V) mostram, a par da prova sensorial informal realizada nas mesmas, que os níveis de escurecimento são inaceitáveis, ao fim de 2 dias de armazenagem, comprometendo a respetiva aceitação sensorial.

As amostras B preparadas a partir de frutos com origem na região de Mafra foram as que manifestaram a maior depreciação visual (Anexo V) o que tem justificação tendo em conta que nestes frutos foi caracterizada a maior incidência de desordens de escurecimento interno (43%).

Estes resultados concordam com os resultados de estudos similares realizados em pera 'Rocha' nos quais ficou demonstrado que a intensificação do escurecimento superficial nas superfícies descascadas, nas fases iniciais de armazenagem (3 dias), constituiu o principal fator a comprometer a aceitação sensorial do produto, sendo por isso a aplicação de tratamentos de prevenção ao escurecimento uma condição obrigatória na preparação deste fruto em processamento mínimo.

## **pH e TSS**

Na Tabela 7 são apresentados os valores médios de pH e TSS das amostras de pera 'Rocha' minimamente processadas, durante a armazenagem (7 dias, 5 °C).

Tabela 7 - Valores médios ( $\pm$ DP) de pH e TSS dos frutos minimamente processados, nos dias 0, 2 e 7.

Dia	Id_am	pH	TSS
0	A	4,8 <sup>f</sup> $\pm$ 0,0	11,4 <sup>bc</sup> $\pm$ 0,1
	B	4,8 <sup>ef</sup> $\pm$ 0,0	12,4 <sup>bc</sup> $\pm$ 0,1
	C	4,7 <sup>ab</sup> $\pm$ 0,0	12,1 <sup>bc</sup> $\pm$ 0,1
2	A	4,6 <sup>cd</sup> $\pm$ 0,0	10,6 <sup>bc</sup> $\pm$ 0,2
	B	4,7 <sup>bc</sup> $\pm$ 0,0	11,4 <sup>abc</sup> $\pm$ 0,7
	C	4,5 <sup>d</sup> $\pm$ 0,0	12,1 <sup>ac</sup> $\pm$ 0,2
7	A	4,9 <sup>e</sup> $\pm$ 0,0	10,7 <sup>a</sup> $\pm$ 0,0
	B	4,8 <sup>ef</sup> $\pm$ 0,0	11,5 <sup>ac</sup> $\pm$ 0,0
	C	4,8 <sup>af</sup> $\pm$ 0,0	12,5 <sup>a</sup> $\pm$ 0,1

Valores médios com letras diferentes representam diferenças significativas a  $p=0,05$  (Teste de Tukey).

Os valores de pH apresentados assinalam diferenças significativas ( $p<0,05$ ) entre amostras e durante a armazenagem. Do dia 0 até ao 2º dia de análise, ambas as amostras diminuíram significativamente o valor de pH, tendência que se inverteu até ao 7º dia de armazenagem onde todas as amostras registaram valores superiores.

A evolução dos valores de TSS, nas amostras analisadas (A, B e C), não apresentou diferenças significativas ( $p>0,05$ ) ao longo do período de armazenagem, refletindo um comportamento de manutenção face aos valores iniciais. Por outro lado, as amostras apresentaram diferenças significativas entre si, nomeadamente as amostras A e amostra C, com variações de TSS de ca -0.7 e 0.4 °Brix, respetivamente, face ao dia 0.

### Compostos fenólicos totais

Nas Figuras 29, apresentam-se os valores médios do teor de compostos fenólicos totais (CFT) das amostras de pera 'Rocha' minimamente processadas, durante a armazenagem (7 dias, 5 °C).

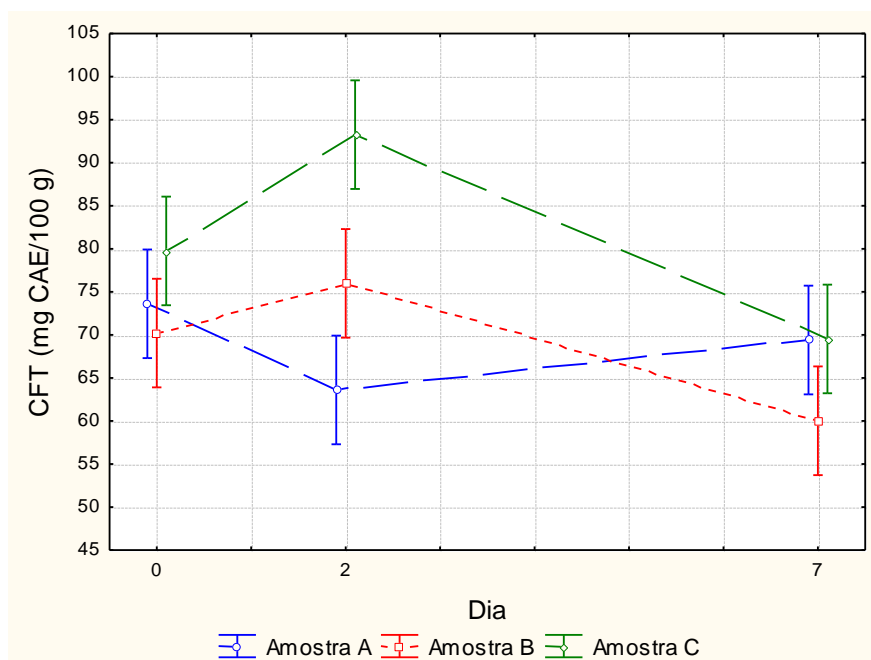


Figura 29 – Valores de CFT dos frutos minimamente processados, nos dias 0, 2 e 7. Barras verticais correspondem ao intervalo de confiança a 95%.

Os teores de compostos fenólicos totais (CFT) nas amostras de pera ‘Rocha’ minimamente processada durante a armazenagem (Fig. 29), a variar na gama 60 – 93 mg CAE 100 g<sup>-1</sup>, não revelaram diferenças significativas entre si ( $p > 0,05$ ), com exceção da amostra C no dia 2, em que se contabilizou um aumento ( $p < 0,05$ ) face ao dia 0.

Esta caracterização assinala um comportamento de estabilidade no teor fenólico do fruto minimamente processado ao longo da armazenagem refrigerada que pode ser importante do ponto de vista funcional enquanto garante os níveis de capacidade antioxidante no produto.

## Capítulo III - Conclusões Gerais

---

### **Tópico 1 - Relação entre parâmetros da qualidade do fruto e a incidência de manifestação a desordens de escurecimento interno**

---

*Identificar os fatores que condicionam a suscetibilidade de pera 'Rocha' a acidentes fisiológicos de escurecimento interno (EI)*

---

- Os frutos de pera 'Rocha' apresentaram distinta incidência às desordens de escurecimento interno em função da localização geográfica de produção. Os frutos de Mafra e Lourinhã com 28 e 43% de EI, respetivamente, em contraste com os frutos de Alcobaça nos quais não foram detetados sintomas (0% de EI).
- Os desvios nas condições de armazenagem ACD dos frutos utilizados neste estudo face às condições recomendadas para a pera 'Rocha' (pressões parciais de O<sub>2</sub> / CO<sub>2</sub>), poderão ter contribuído para acentuar a diferença na incidência a desordens de escurecimento interno.
- Os parâmetros da qualidade mais distintivos nos frutos de Alcobaça, de calibre ligeiramente inferior (classe 55/60 mm), referem-se à superioridade ( $p < 0,05$ ) nos teores em AA (4,8 mg / 100g) e de CFT (111,0 mg CAE/ 100 g), com acréscimos de ca de 20 % e 40 %, respetivamente, na comparação com frutos das restantes origens.
- De acordo com a análise de componentes principais foi possível verificar que frutos de pera 'Rocha' com maior teor em cálcio, menor teor em potássio e maior capacidade antioxidantes (CFT) serão mais resistentes a desordens de escurecimento interno. Por outro lado, quanto mais avançado o estado de maturação pós-colheita e menor o teor de ácido ascórbico, maior a incidência destes sintomas.
- Poderá ainda ser especulada a envolvimento de dois mecanismos com influência na suscetibilidade de pera 'Rocha' a desordens de escurecimento interno.
  - O mecanismo mais importante (onde a variável EI incidência teve o peso mais significativo) poderá expressar fatores pré-colheita relacionados com a integridade dos tecidos da polpa uma vez que inclui a variação de nutrientes minerais (Ca e K) com influência direta na estruturação das membranas celulares. Neste mecanismo estão igualmente representados os níveis de CFT a traduzir indiretamente a capacidade antioxidante do fruto e, ainda, o teor de sólidos solúveis. No outro mecanismo estão maioritariamente representados fatores pós-colheita, tais como, os índices de maturação pós-colheita (acidez e tonalidade do epicarpo) e, ainda, o teor de ácido ascórbico.

## **Tópico 2 - Distribuição espacial do ácido ascórbico e dos compostos fenólicos totais na polpa dos frutos**

*Esclarecer as relações do EI com os teores de ácido ascórbico e de compostos fenólicos totais*

---

- O envolvimento do ácido ascórbico nos mecanismos de prevenção a desordens de escurecimento interno de pera 'Rocha' não foi claramente evidenciado, apesar da constatação de teores significativamente superiores nos frutos oriundos de Alcobaça, (0% de EI), face a frutos com outras origens (Mafra e Lourinhã, 43% e 28 % de EI, respetivamente).
- No entanto, na zona central da polpa, a constatação de concentrações de AA sem diferenças significativas entre frutos com e sem manifestação ao EI e teores elevado de CFT nos frutos de elevado EI, parece sugerir que a capacidade de resposta dos tecidos ao desequilíbrio redox induzido nas desordens de escurecimento interno é preferencialmente realizado por compostos de natureza fenólica.

## **Tópico 3 - Potencial de amadurecimento à temperatura ambiente**

*Avaliar a qualidade pós-colheita da pera 'Rocha', em condições de simulação da comercialização*

---

- A evolução da qualidade dos frutos de pera 'Rocha' em condições que simulam a fase de comercialização (8 dias; TA) foi semelhante, independentemente da respetiva origem geográfica. De acordo com os atributos da qualidade avaliados o período de 4 dias aparenta ser o tempo de prateleira máximo para a aceitação comercial dos frutos 'in natura'.
- Faz-se notar que embora a origem dos frutos possa não influenciar a respetiva aceitação comercial o mesmo pode não suceder com a continuidade de compra tendo em conta a incidência de desordens de escurecimento interno (EI) caracterizada nos frutos (Alcobaça-0%, Mafra 43% e Lourinhã 28%) apenas detetável após a respetiva abertura.

## **Tópico 4 - Aptidão para processamento mínimo**

*Avaliar a aptidão dos frutos para processamento mínimo em função da qualidade inicial da matéria-prima*

---

- No fruto fresco cortado verificou-se a manutenção dos valores iniciais (dia 0) relativos aos índices de qualidade (TSS e pH) e de teor em compostos fenólicos totais durante 7 dias de armazenagem (5 °C). A intensificação do escurecimento superficial nas superfícies descascadas de pera 'Rocha' fresca cortada, ao longo da armazenagem, constituiu o único fator que comprometeu a aceitação sensorial do produto.
- O comportamento do fruto em processamento mínimo foi influenciado pela qualidade inicial da matéria-prima. Apesar do escurecimento das superfícies descascadas ter sido semelhante, os níveis de escurecimento das superfícies cortadas foram mais acentuados nos frutos com manifestação de sintomas. Os frutos originários de Mafra, de elevada incidência a desordens de escurecimento interno (43%), demonstraram assim uma menor aptidão para este tipo de processamento.



## Referências bibliográficas

---

- Abreu, M. (2010). Tratamento Integrados para a Qualidade de Pera 'Rocha' Minimamente Processada. Lisboa: Universidade Técnica de Lisboa - Instituto Superior de Agronomia. 293. Dissertação para obtenção do grau de Doutor em Engenharia Agro-Industrial.
- Abreu, M.; Alegria, C., Gonçalves, E., Pinheiro, J.; Moldão-Martins, M.; Empis, J. (2011). Modeling of Preheat Treatment Optimization Applied To Fresh-Cut "Rocha" Pear. *Journal of Food Quality*, 34 (5): 315-326.
- Agar, I.T., Biasi W.V., and Mitcham E.J. (1999). Exogenous ethylene accelerates ripening responses in 'Bartlett' pears regardless of maturity or growing region. *Postharvest Biol. Technol.* 17: 67–78
- Alegria, C.; Pinheiro, J.; Gonçalves, E.; Fernandes, I.; Moldão-Martins, M.; Abreu, M. (2009). Quality attributes of shredded carrot (*Daucus carota* L. cv. Nantes) as affected by alternative decontamination processes to chlorine. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 10: 61-69.
- Amarante, C.V.T.; Miqueloto, A.; Freitas, S.T.; Steffens, C.A.; Silveira, J.P.G; Corrêa, T.R., (2013). Fruit sampling methods to quantify calcium and magnesium contents to predict bitter pit development in 'Fuji' apple: A multivariate approach. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, v.157, 19-23.
- Asada, K. (1992) Ascorbate peroxidase-hydrogen peroxide scavenging enzyme in plants. *Physiol. Plant.* 85, 235-241.
- Associação Nacional de Produtores de Pera 'Rocha'- ANP. (1997). Caderno de Especificações Pera 'Rocha' do Oeste – Denominação de Origem, Cadaval. 5-15.
- Associação Nacional de Produtores de Pera 'Rocha'.- ANP (2009). Caderno de Especificações Pera 'Rocha' do Oeste D.O.P. 2-7
- Bain JM (1961). Some morphological, anatomical, and physiological changes in the pear fruit (*Pyrus communis* var. Williams Bon Chrétien) during development and following harvest. *Australian Journal of Botany* 9, 99 –123.
- Beuchat, L. (1998). Surface decontamination of fruits and vegetables eaten raw: a review. *Food Safety Issues*, 98. (2): 42.
- Brackmann, A.; Chitarra, A.B.(1998). Atmosfera controlada e atmosfera modificada. Armazenamento e processamento de produtos agrícolas. Lavras: UFLA/SBEA, 133-170
- Burns, J.K. (1995). Lightly processed fruits and Vegetables: Introduction to the colloquium. *HortScience* 30:14.
- Cantillano, R.F.F.(1987). Fisiologia e manejo de pós-colheita de ameixa. Pelotas: EMBRAPA-CNPFT. 10p. (Comunicado Técnico, 54).
- Carvalho NDSP, Arentshorst M., Weenink XO, Punt PJ, Van Den Hondel CAMJJ, Ram AFJ (2011). Functional YFP-tagging of the essential GDP-mannose transporter reveals an important role for the secretion related small GTPase SrgC protein in maintenance of Golgi bodies in *Aspergillus niger*. *Fungal Biol* 115: 253-264

Chiriboga, M.; Schtsmans, W.C.; Larrigaudière, C.; Dupille, E.; Recasens, I. (2011). How to prevent ripening blockage in 1-MCP-treated 'Conference' pears. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Oxford, v.91, n.1, 1781-1788.

Ciscato, M., M. Sowinska, M. van de Vem et al, (2001). Fluorescence imaging as a diagnostic tool to detect physiological disorders during storage of apples. *Acta Horticultrae* 553:507-512

Corrêa, T.R. (2010). Qualidade de frutos e ocorrência de degenerescência de polpa em maçãs 'Fuji' armazenadas em atmosfera controlada em função das condições climáticas do pomar, porta-enxerto e da nutrição mineral. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages. 69p.

Corrêa, T.R.; Steffens, C.A.; Amarante, C.V.T.; Tanaka, H.; Stanger, M.C.; Brackmann, A.; Ernani, P.R. (2012). Composição mineral, qualidade e degenerescência de polpa de maçãs 'Fuji' em diferentes porta-enxertos durante armazenamento em atmosfera controlada. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, v. 34, n.1, 33-40.

Crisosto, C., Garner, D., Crisosto, G., Sibbett, G., and Day, K. (1994). Early harvest prevents internal browning in Asian pears. *California Agric.* 740, 17-19.

Deuchande, T., Fidalgo, F., Vasconcelos, M., Costa, D.V.T.A. and Larrigaudière, C. (2015). Internal browning disorders in 'Rocha' pear stored under high CO<sub>2</sub> atmospheres are triggered by oxidative stress. *Acta Hortic.* 1071, 771-778.

Drake, S.R.; Gix, R.D.; Coureau, C. (2001) Quality of 'Anjou' pears after different types of controlled atmosphere storage. *Journal of Food Quality*, Oxford, v.24, n.1, 27-36

Ekman, J.H.; Clayton, M.; Biasi, W.V.; Mitcham, E.J. (2004). Interactions between 1- MCP concentration, treatment interval and storage time for 'Bartlett' pears. *Postharvest Biology and Technology*, Amsterdam, v.31, n.1, 127- 136.

Ferguson, I. B.; Volz, R.; Wolf, A. (1999). Preharvest factors affecting physiological disorders of fruit. *Postharvest Biology and Technology*, Amsterdam, v. 15, 255-262

Fonseca, S., Monteiro, L., Barreiro, M.G., Pais, M.S. (2005). Expression of genes encoding cell wall modifying enzymes is induced by cold storage and reflects changes in pear fruit texture. *J. Exp. Bot.* 56 (418), 2029–2039.

Forney, C.F., and Jordan, M.A., (1998). Induction of volatile compounds in broccoli by postharvest hot water dips. *J. Agric. Food Chem.* 46, 5295-5301.

Franck C, Baetens M, Lammertyn J, Scheerlinck N, Davey MW, Nikolai BM (2003) Ascorbic acid mapping to study core breakdown development in "Conference" pears. *Postharvest Biol Technol* 30: 133–142.

Franck, C., Lammertyn, J., Tri Ho, Q., Verboven, P., Verlinden, B. e Nicolai B. M. (2007). Browning disorders in pear fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 43(1): 1-13.

Freitas, S.T.; Amarante, C.V.T.; Labavitch, J.M.; Mitcham, E.J. (2010) Cellular approach to understand bitter pit development in apple fruit. *Postharvest Biology and Technology*, Amsterdam, v.57, 6-13.

Fu L., Cao J, Li Q, Lin L, Jiang W, (2007). Effect of 1-methylcyclopropene on fruit quality and physiological disorder in Yali pear (*Pyrus bretschneideri* Rehd.) during storage. *Food Sci Technol Int* 13: 49-54

Fu, F.-X., M. E. Warner, Y.Zhang, Y.Feng, and D. A. Hutchins. (2007). Effects of increased temperature and CO<sub>2</sub> on photo-synthesis, growth and elemental ratios of marine *Synecho-coccus* and *Prochlorococcus* (Cyanobacteria). *J. Phycol.*43:485–496

Galvis-Sánchez, A.C.; Fonseca, S.C.; Morais, A.M.M.B.; Malcata, (2004) F.X. Sensorial and physiocochemical quality responses of pears (co 'Rocha') to long-term storage under controlled atmospheres. *Journal of the Science of Food and Agriculture, Oxford*, 84, 1,1646-1656,

Galvis-Sánchez, A., Gil-Izquierdo, A. e Gil, M. I. (2003). Comparative study of six pear cultivars in terms of their phenolic and vitamin C contents and antioxidant capacity. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83(10): 995-1003.

Galvis-Sánchez, A.C.; Morais, A.M.M.B. (2001). Effects of controlled atmosphere (CA) storage on pectinmethylesterase (PME) activity and texture of 'Rocha' pears. *Journal of the Science of Food and Agriculture, Oxford*, 82, 1, 143-145.

Giraud, M., Westercamp, P., Coureau, C., Chapon, J.F., Berrie, A., (2001).Recognizing Postharvest Diseases of Apple and Pear. *Centre Technique Interprofessionel des Fruits et Légumes*, Paris.

Gorny, J.; Cifuentes, R.; Hess-Pierce, B.; Kader, A. (2000). Quality changes in fresh-cut pear slices as affected by cultivar, ripeness storage, fruit size, and storage regime. *Journal of Food Science*, 65 (3): 541-544.

GPP. (2007). Pera: Diagnóstico sectorial. Ministério da Agricultura do Desenvolvimento Rural e das Pescas. Lisboa, Portugal.

GPP. (2012). Ficha de Internacionalização: Pera. GlobalAgriMar. Lisboa, Portuga

Guerzoni, M.; Gianotti, A.; Corbo, M.; Sinigaglia, M. (1996). Shelf-life modeling for fresh-cut vegetables. *Postharvest Biology and Technology*, 9: 195-207.

Hamauzu Y, Hanakawa T. (2003): Relation of highly polymerised procyanidin to the potential browning susceptibility in pear fruits. *J Jpn Soc Horticulture Sci*, 72:415-421

HO, Q.; Verlinden, B.; Verboven, P.; Nicolaï, B. (2006). Gas diffusion at different positions in the pear. *Postharvest Biology and Technology, Amsterdam*, 41, 113-120.

Isidoro, N. e Almeida, D. P. F. (2005). Amadurecimento de Pera 'Rocha' tratada com diferentes concentrações de 1-metilciclopropeno. *Actas Portuguesas de Horticultura*; In: V Congresso Ibérico de Ciências Hortícolas. IV Congresso Ibero-americano de Ciências Hortícolas, 346-351

James, H.J.; Jobling, J.J.(2009). Contrasting the structure and morphology of the radial and diffuse flesh browning disorders and CO<sub>2</sub> injury of 'Cripps Pink' apples. *Postharvest Biology and Technology, Amsterdam*, 53, 36-42.

Kim, J.; Yousef, E.; Dave, S. (1999). Application of ozone for enhancing the microbiological safety and quality of foods: a review. *Journal of Food Protection*, 62 (9): 1071-1087.

Lammertyn J, Scheerlinck N, Verlinden BE, Schotsmans W, Nicolaï BM. (2001). Simultaneous Determination of oxygen diffusivity and respiration in pear skin and tissue. *Postharvest Biology and Technology* 23, 93–104.

Lammertyn, J.; Scheerlinck, N.; Jancsó, P. Verlinden, B.E.; Nicolaï, B.M. (2003). A respiration – diffusion model for Conference pears I: model development and validation. *Postharvest Biology and Technology*, Amsterdam, v.30, 29 – 42.

Larrigaudière, C., Pintó, E., Lenthéric, I. And Vendrell, M. (2001). Involvement of oxidative processes in the development of core browning in controlled-atmosphere stored pears. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* 76, 157–162

Larrigaudière, C., Vilaplana, R., Soria, Y. and Recasens, I. (2004), Oxidative behaviour of Blanquilla pears treated with 1-methylcyclopropene during cold storage. *J. Sci. Food Agric.*, 84: 1871–1877.

Laurila, E., Ahvenainen, R. (2002). Minimal processing of fresh fruits and vegetables. In: W. Jongen (Ed.), *Fruit and vegetable processing*. Cambridge, UK/Boca Raton, FL: Woodhead Publishing Limited/CRC Press LLC.

Lelièvre, J.M.; Latché. A.; Jones, B; Bouzayen, M.; Pech, J.C. (1997) Ethylene and fruit ripening. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.101, 727-739.

Lenthéric, I., E. Pintó, J. Graell, and C. Larrigaudière. (2003). Effects of CO<sub>2</sub> pre-treatment on oxidative metabolism and core-browning incidence in controlled atmosphere stored pears. *J. Hort. Sci. Biotechnol.* 78:177–181.

Lenthéric, I., Pinto, E., Vendrell, M., Larrigaudière, C. (1999). Harvest date affects the antioxidative systems in pear fruits. *J. Hort. Sci. Biotechnol.* 74, 791-795.

Luchsinger, L.E.; Walsh, C.S (1993). Changes in ethylene rate and ground color in peaches (cv. Redhaven and Marqueen) and nectarines (cv. Fantasia) during maturation and ripening. *Acta Horticulturae*. Wageningen, v.343, 70-72.

Miqueloto, A.; Amarante, C.V.T.; Steffens, C.A.; Santos, A.; Miqueloto, T.; Silveira, J.P.G. (2011) Atributos fisiológicos, físico-químicos e minerais associados à ocorrência de “bitter pit” em maçãs. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 46, 7, 689-696.

Murata, M., Kurokami, C. e Homma, S. (1992). Purification and some properties of chlorogenic acid oxidase from apple (*Malus pumila*). *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 56: 1705–1710.

Murayama, H.; Katsumata, T. Horiuchi, O.; Fukushima, T. (2002). Relationship between fruit softening and cell wall polysaccharides in 67 pears after different storage periods. *Postharvest Biology and Technology*, Amsterdam, v.26, n.1, 15-21.

Neuwald, D.A.; Kitzmann, D.; Streif, J. (2008) Possible prediction of physiological storage disorders in ‘Braeburn’ apples comparing fruit of different orchards. *Acta Horticulturae*, Wellington, n.796, 211- 216.

Pedreschi, R., M. Hertog. J. Robben et al. (2009,) Gel-based proteomics approach to the study of metabolic changes in pear tissue during tissue during storage. *J. Agric. Food Chem* 57:6997-7004.

Pedreschi, R.; Hertog, M.; Robben, J.; Noben, J.; Nicolaï, B. (2008) Physiological implications of controlled atmosphere storage of ‘Conference’ pears (*Pyrus communis* L.): A proteomic approach. *Postharvest Biology and Technology*, Amsterdam, v.50, 110-116.

Pintó, E., Lenthéric, I., Vendrell, M. and Larrigaudière, C.(2001). Role of fermentative and antioxidant metabolisms in the induction of core browning in controlled-atmosphere stored pears. *J. Sci. Food Agric.* 81, 364–370

Pintó, E., Lenthéric, I., Vendrell, M., and Larrigaudière, C., 2010. Relationship between quality parameters and internal disorders in pear by means of multivariate analysis *Acta Horticulturae*, 98-106

Richardson, D., and Kupperman, E. (1997).Controlled atmosphere storage of pears. *Proceeding 7th International Controlled Atmosphere Research Conference*. Davis, California, 31-35.

Roelofs, F.P., and De Jager, A. (1997). Reduction of Brown heart in Conference pears. *Proceeding 7th Intl. Controlled Atmosphere Research Conference*, Davis, July 13-18, Apples and pears 2, 138-144.

Salta, M., et al. 2010. Designing biomimetic antifouling surfaces. *Philos Transact A Math Phys Eng Sci*, 368: 4729-4754

Saquet, A.A.; Streif, J. (2006) Fermentative metabolism in ‘Conference’ pears under various storage conditions. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, Ashford, 81, 5, 910-914.

Saquet, A.A.; Streif, J., Bangerth, F. (2003) Energy metabolism and membrane lipid alterations in relation to brown heart development in ‘Conference’ pears during delayed controlled atmosphere storage. *Postharvest Biology and Technology*, Amsterdam, 30, 123-132.

Seibert, E.; Barradas, C.I.N.; Araujo, P.J.; Bender, R.J.(2000) Efeito do ethephon e da frigoconservação na maturação de pêras cv. Packham’s Triumph. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 35, 1, 55-62.

Seymour, I.; Burfoot, D.; Smith, R.; Cox, L.; Lockwood, A. (2002). Ultrasound decontamination of minimally processed fruits and vegetables. *International Journal of Food Science and Technology*, 37: 547-557.

Silva, F.J.P., Gomes, M.H., Fidalgo, F., Rodrigues, J.A. & Almeida, D.P.F. (2010). Antioxidant properties and fruit quality during long-term storage of ‘Rocha’ pear: Effects of maturity and storage conditions. *Journal of Food Quality* 33: 1-20.

Silva, J.; Finger, F.; Corrêa, P. (2000) Armazenamento de frutas e hortaliças. In. *Secagem e armazenagem de produtos agrícolas*. Aprenda Fácil., 18.

Silveira, J.P.G.; Amarante, C.V.T.; Steffens, C.A.; Miqueloto, A. Katsurayama, J.M. (2012) A inibição na síntese de giberilina reduz o crescimento vegetativo em macieiras e proporciona controle de “bitter pit” nos frutos. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, v.34, n.2, p.321-651.

Simons, L.; Sanguansri, P. (1997). Advances in washing of minimally processed vegetables. *Food Australia*, 49 (2): 75-80.

Smillie, R.M., Hetherington, S.E., Nott, R., Chaplin, G.R., and Wade, N.L., (1987). Application of chlorophyll fluorescence to the postharvest physiology and storage of mango and banana fruit and the chilling tolerance of mango cultivars. *Asian Food J.* 3, 55-59.

Soares, J., Silva, A., Alexandre, J. (2001). *O Livro da Pera ‘Rocha’ - Volume Primeiro*. ANP - Associação Nacional de Produtores de Pera ‘Rocha’, Cadaval.

Sugar, D., Basile, S.R. (2006). Ethylene treatment promotes early ripening in mature Comice pears. *HortTechnology* 1, 89–91

Sugar, D., Einhorn, T.C. (2011). Conditioning temperature and harvest maturity influence induction of ripening capacity in d'Anjou' pear fruit. *Postharvest Biology and Technology*, Amsterdam, 60, 1, 121-124

Sugar, D.; Basile, S.R. (2013). Integrated ethylene and temperature conditioning for induction of ripening capacity in 'Anjou' and 'Comice' pears. *Postharvest Biology and Technology*, Amsterdam, 83, 9-16

TriPortugal. 'Rocha' Pear Disponível em <http://www.triportugal.pt/pt/pear.html>. Acesso em 10/09/2015

Valero, C., Barreiro, P., Ortiz, C. (2001). Optical detection of mealiness in apples by laser TDRS. *Proc. 4th. Int. Conf. On Postharvest. Acta Hort.* 553, 513-517.

Van Kooten, O., Mensink, M.G.J., Otma, E.C., Van Schaik, A.C.R. and Shouten, S.P., (1992). Chilling damage of dark stored cucumbers (*Cucumis sativus* L.) affects the maximum quantum yield of photosystem 2. In: N. Murata (ed.), *Progress in Photosynthesis research*, vol. IV. Kluwer Academic, Dordrecht. The Netherlands, 161-164.

Vangdal, E. Eating quality of pears (1982). *Acta Agriculture Scandinavica*, Norway, 32, 135-139.

Veltman, R.H., Kho, R.M., van Schaik, A.C.R., Sanders, M.G. e Oosterhaven, J. (2000). Ascorbic acid and tissue browning in pears (*Pyrus communis* L. cvs 'Rocha' and Conference) under controlled atmosphere conditions. *Postharvest Biology and Technology*, 19(2): 129-137.

Veltman, R.H., Sanders, M.G., Persijn, S.T., Peppelenbos, H.W. and Oosterhaven, J. (1999). Decreased ascorbic acid levels and brown core development in pears (*Pyrus communis* L. cv. Conference). *Physiol. Plant.* 107, 39 – 45.

Verlinden, B.E., de Jager, A., Lammertyn, J., Schotsmans, W., Nicolai, B.M., (2002). Effect of harvest and delayed controlled atmosphere storage conditions on core breakdown incidence in Conference pears. *Biosyst. Eng.* 83, 339–347.

Vicini, L., 2005. *Análise multivariada da teoria à prática*. Santa Maria: UFSM, CCNE. 215p.

Watada, E. A., Qi, L. (1999) Quality of fresh-cut produce. *Postharvest Biology and technology* Volume 15, Issue 3, March 1999, 201–205.

Weber, A.; Brackmann, A.; Anese, R.O.; Both, V.; Pavanello, E. (2013). Atmosfera controlada para o armazenamento da maçã 'Maxi Gala'. *Revista Ciência Agronômica*, Fortaleza, 44, (2), 294-301.

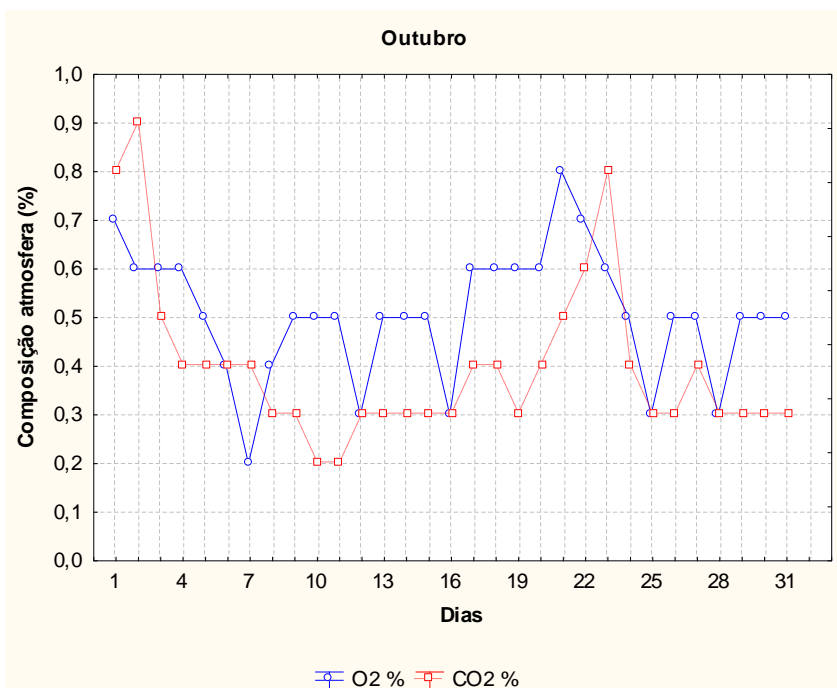
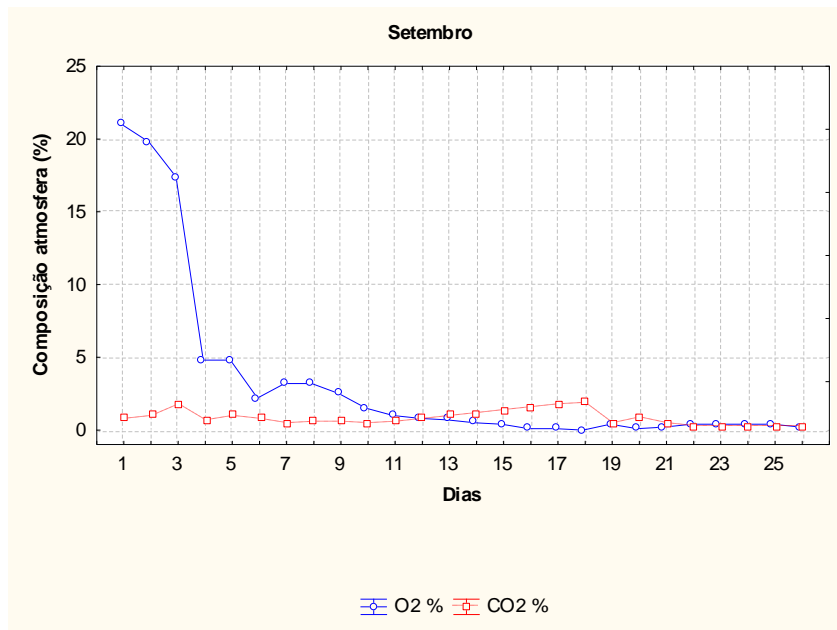
Yan, H., Q. Yu, Z.-C. Zhu, R. B. Myneni, H.-M. Yan, S.-Q. Wang, and H. H. Shugart (2013), Diagnostic analysis of interannual variation of global land evapotranspiration over 1982–2011: Assessing the impact of ENSO, *J. Geophys. Res. Atmos.*, 118.

Yazdani, N., Arzanik. Mostofi, Y., Shekarchi, M., (2011).  $\alpha$ -Farnesene and antioxidative enzyme systems in Asian pear (*Pyrus serotina* Rehd.) fruit. *Postharvest Biol. Tech.* 59, 227-231

Zerbini, P.E., Rizzolo, A., Brambilla, A., Grassi, M. (2002). Loss of ascorbic acid during storage of Conference pears in relation to the appearance of brown heart. *J. Sci. Food Agric.* 82, 1-7.

## Anexos

### Anexo I



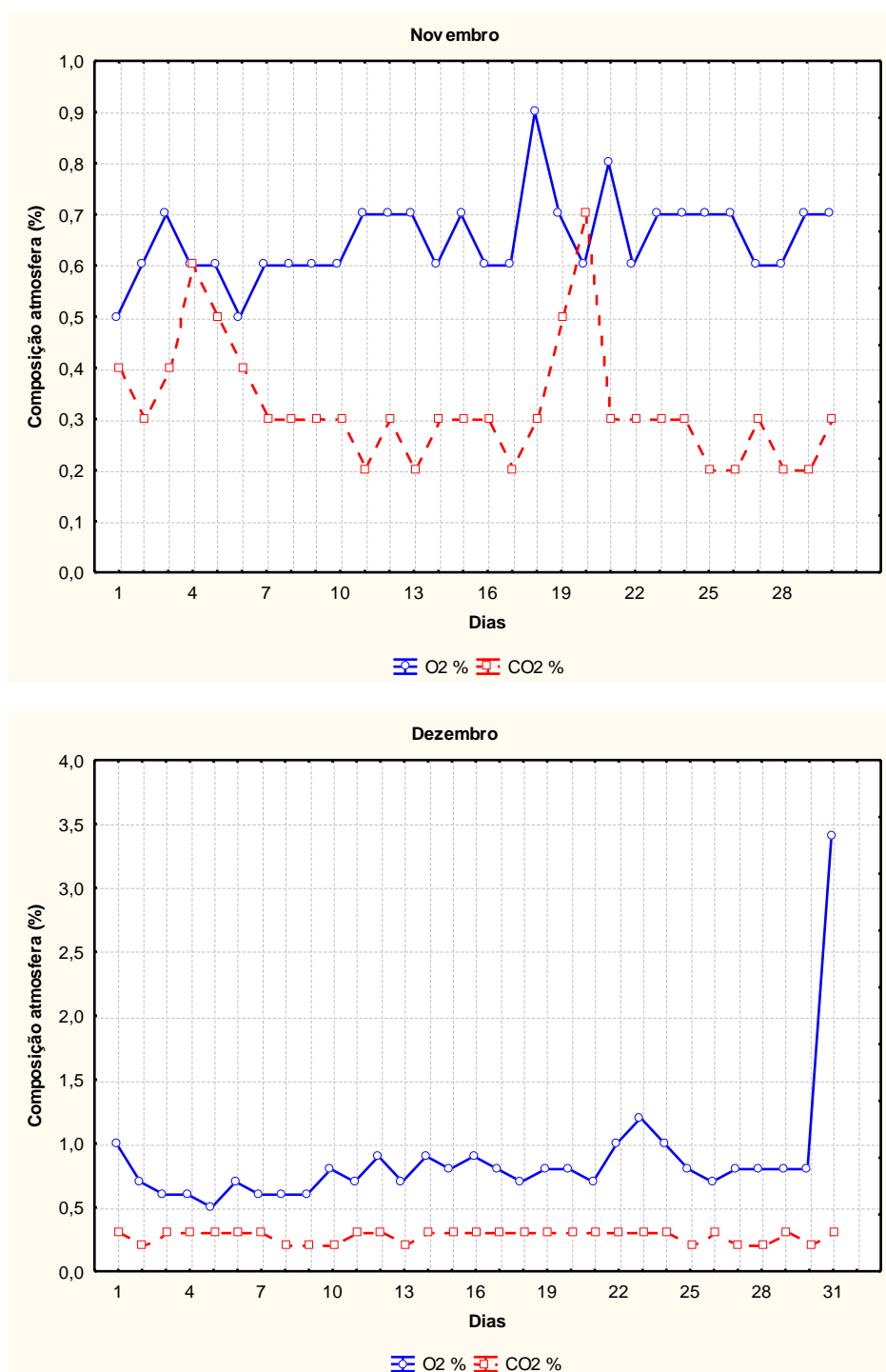


Figura A1 – Gráficos representativos da composição atmosférica (O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>) das câmaras de atmosfera controlada dinâmica, nos meses indicados do ano de 2014.



## Anexo II

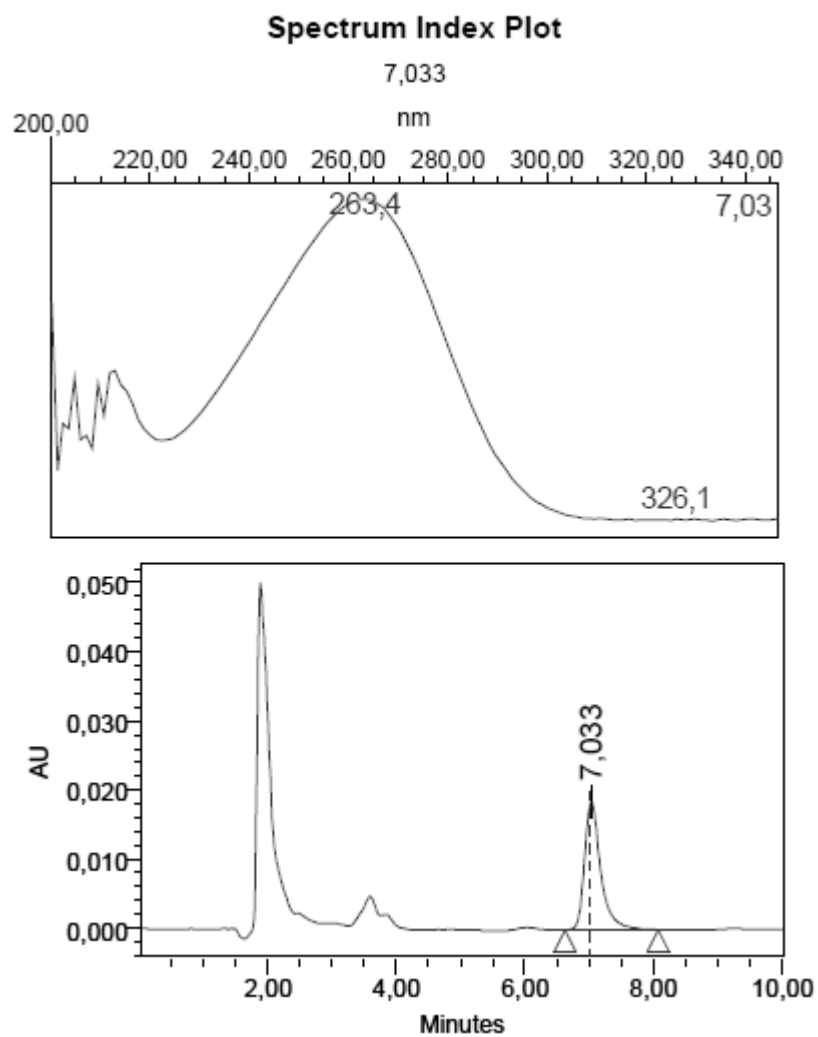


Figura A2 – Espectro e Cromatograma obtidos na determinação, por HPLC, do Ácido Ascórbico Total

### Anexo III

Tabela a1 - Valores médios ( $\pm$ DP) dos atributos CIELab ( $L^*$ , C,  $^{\circ}h$  e WI) do epicarpo ( $_{ext}$ ), das amostras de pera 'Rocha' (Ensaio I).

Quinta	Id_am	$L^*_{ext}$	$C_{ext}$	$h^{\circ}_{ext}$	$WI_{ext}$
Amaros	A	66,3 <sup>a</sup> $\pm$ 2,8	43,8 <sup>ab</sup> $\pm$ 1,9	104,8 <sup>a</sup> $\pm$ 3,6	44,6 <sup>a</sup> $\pm$ 1,8
Baptista	B	68,8 <sup>b</sup> $\pm$ 2,9	44,9 <sup>a</sup> $\pm$ 2,6	105,4 <sup>a</sup> $\pm$ 4,0	45,2 <sup>a</sup> $\pm$ 3,0
Quinta do Rol	C	69,5 <sup>b</sup> $\pm$ 3,4	43,0 <sup>b</sup> $\pm$ 2,5	102,1 <sup>b</sup> $\pm$ 3,2	47,2 <sup>a</sup> $\pm$ 3,2

Valores médios com letras diferentes representam diferenças significativas a  $p=0,05$  (Teste de Tukey).

Tabela a2- Valores médios ( $\pm$ DP) dos atributos CIELab ( $L^*$ , C,  $^{\circ}h$  e WI) da cor da polpa ( $_{int}$ ) dos frutos avaliados nas amostras de pera 'Rocha' (Ensaio I).

Quinta	Id_am	$L^*_{int}$	$C_{int}$	$h^{\circ}_{int}$	$WI_{int}$
Amaros	A	81,2 <sup>a</sup> $\pm$ 1,2	11,3 <sup>a</sup> $\pm$ 1,4	103,7 <sup>a</sup> $\pm$ 1,4	78,0 <sup>a</sup> $\pm$ 1,4
Baptista	B	79,1 <sup>b</sup> $\pm$ 1,9	11,8 <sup>a</sup> $\pm$ 1,9	101,5 <sup>b</sup> $\pm$ 1,3	75,9 <sup>b</sup> $\pm$ 2,2
Quinta do Rol	C	80,6 <sup>a</sup> $\pm$ 1,4	11,4 <sup>a</sup> $\pm$ 1,5	101,7 <sup>a</sup> $\pm$ 1,4	77,5 <sup>a</sup> $\pm$ 1,5

Valores médios com letras diferentes representam diferenças significativas a  $p=0,05$  (Teste de Tukey).

Tabela a3 - Componentes Minerais de Pera (5 variedades) \*de parte edível (Adaptada de INSA)

Componentes	por 100 g*
Cinza, g	0,36
Sódio (Na), mg	8,0
Potássio (K), mg	150
Cálcio (Ca), mg	9,0
Fósforo (P), mg	10
Magnésio (Mg), mg	9,0
Ferro (Fe), mg	0,3
Zinco (Zn), mg	0,2

## Anexo IV




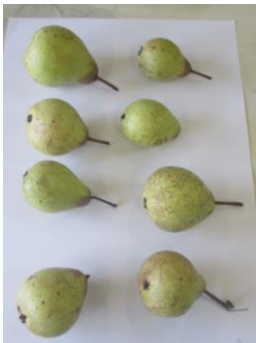








Dia	Amaros (A)	Baptista (B)	Quinta do Rol (C)
0			
4			
6			
8			

Figura A3 – Registos fotográficos frutos armazenados à temperatura ambiente e avaliados nos dias 0, 4, 6 e 8 de armazenagem (Ensaio III)

Tabela a4 – Registos de temperatura da sala de armazenagem (Ensaio III)

Dias	0	4	6	8
Temperaturas registadas ao longo do dia (°C)	18,5	19,6	19,4	19,7
	18,7	19,8	19,8	20,2
	18,9	19,7	19,6	19,5
Temperatura média diária (°C)	18,7	19,7	19,6	19,8

Tabela a5 - Valores médios ( $\pm$ DP) dos atributos CIELab ( $L^*$ , C,  $h^\circ$  e WI) da polpa ( $_{int}$ ) dos frutos armazenados à temperatura ambiente e avaliados em 4 dias distintos (D0, D4, D6, D8).

Dia	Id_am	$L^*_{int}$	$C_{int}$	$h^\circ_{int}$	$WI_{int}$
0	A	81,6 <sup>b</sup> $\pm$ 0,7	11,1 <sup>a</sup> $\pm$ 1,5	103.9 <sup>g</sup> $\pm$ 1.8	78.5 <sup>b</sup> $\pm$ 1.2
	B	80,9 <sup>bc</sup> $\pm$ 0,8	11,3 <sup>a</sup> $\pm$ 1,8	101.6 <sup>df</sup> $\pm$ 1.2	77.8 <sup>ab</sup> $\pm$ 1.4
	C	81,4 <sup>b</sup> $\pm$ 1,4	11,3 <sup>a</sup> $\pm$ 1,6	101.9 <sup>dfg</sup> $\pm$ 1.6	78.2 <sup>ab</sup> $\pm$ 1.4
4	A	79,9 <sup>abc</sup> $\pm$ 1,3	11,5 <sup>a</sup> $\pm$ 1,1	103.2 <sup>fg</sup> $\pm$ 1.1	76.8 <sup>abc</sup> $\pm$ 1.5
	B	79,8 <sup>abc</sup> $\pm$ 1,2	11,5 <sup>a</sup> $\pm$ 1,7	100.2 <sup>cde</sup> $\pm$ 1.1	76.7 <sup>abc</sup> $\pm$ 1.7
	C	79,2 <sup>ac</sup> $\pm$ 1,1	11,1 <sup>a</sup> $\pm$ 1,8	101.0 <sup>de</sup> $\pm$ 1.2	76.4 <sup>abcd</sup> $\pm$ 1.6
6	A	79,8 <sup>abc</sup> $\pm$ 0,7	10.8 <sup>a</sup> $\pm$ 1,1	99.3 <sup>bce</sup> $\pm$ 1.8	77.1 <sup>abc</sup> $\pm$ 1.1
	B	79,7 <sup>abc</sup> $\pm$ 1,4	11,3 <sup>a</sup> $\pm$ 2,1	98.6 <sup>abc</sup> $\pm$ 1.0	76.7 <sup>abc</sup> $\pm$ 2.0
	C	80,2 <sup>abc</sup> $\pm$ 1,2	10.6 <sup>a</sup> $\pm$ 1,2	98.0 <sup>ab</sup> $\pm$ 1.0	77.5 <sup>abc</sup> $\pm$ 1.4
8	A	78,5 <sup>ad</sup> $\pm$ 2,8	13.6 <sup>a</sup> $\pm$ 7,8	98.4 <sup>a<sup>bc</sup></sup> $\pm$ 2.7	74.3 <sup>cd</sup> $\pm$ 7.3
	B	76,5 <sup>d</sup> $\pm$ 4,6	12,3 <sup>a</sup> $\pm$ 2,1	96.9 <sup>a</sup> $\pm$ 3,8	73.4 <sup>d</sup> $\pm$ 4,8
	C	78,6 <sup>a</sup> $\pm$ 0,9	12,6 <sup>a</sup> $\pm$ 1,4	98,3 <sup>abc</sup> $\pm$ 1,1	75,2 <sup>abc</sup> $\pm$ 1,2

Valores médios com letras diferentes representam diferenças significativas a  $p=0,05$  (Teste de Tukey).

Tabela a6 - Valores médios ( $\pm$ DP) dos atributos CIELab ( $L^*$ ,  $C$ ,  $h^\circ$  e  $WI$ ) do epicarpo ( $_{int}$ ) dos frutos armazenados à temperatura ambiente e avaliados em 4 dias distintos (D0, D4, D6, D8).

Dia	Id_am	$L^*_{ext}$	$C_{ext}$	$h^\circ_{ext}$	$WI_{ext}$
0	A	64,6 <sup>e</sup> $\pm$ 2,8	41,9 <sup>a</sup> $\pm$ 1,8	103,8 <sup>a</sup> $\pm$ 3,1	45,0 <sup>c</sup> $\pm$ 1,7
	B	68,8 <sup>cde</sup> $\pm$ 2,9	43,9 <sup>ab</sup> $\pm$ 3,2	103,3 <sup>a</sup> $\pm$ 5,0	46,1 <sup>a</sup> $\pm$ 3,3
	C	68,8 <sup>cde</sup> $\pm$ 3,4	42,9 <sup>ab</sup> $\pm$ 1,8	101,9 <sup>ab</sup> $\pm$ 2,8	46,9 <sup>abc</sup> $\pm$ 1,9
4	A	68,6 <sup>c</sup> $\pm$ 2,9	43,4 <sup>ab</sup> $\pm$ 1,6	98,5 <sup>b</sup> $\pm$ 3,1	46,4 <sup>ac</sup> $\pm$ 1,6
	B	73,6 <sup>ab</sup> $\pm$ 2,9	44,2 <sup>ab</sup> $\pm$ 2,3	98,9 <sup>b</sup> $\pm$ 4,3	48,5 <sup>abc</sup> $\pm$ 2,7
	C	72,5 <sup>abd</sup> $\pm$ 3,3	43,3 <sup>ab</sup> $\pm$ 1,7	94,7 <sup>c</sup> $\pm$ 3,4	48,6 <sup>abc</sup> $\pm$ 2,0
6	A	70,6 <sup>bcd</sup> $\pm$ 5,4	43,3 <sup>ab</sup> $\pm$ 2,5	92,1 <sup>cde</sup> $\pm$ 4,6	47,4 <sup>abd</sup> $\pm$ 2,5
	B	75,4 <sup>a</sup> $\pm$ 3,3	42,8 <sup>a</sup> $\pm$ 3,0	93,0 <sup>cd</sup> $\pm$ 3,3	50,6 <sup>d</sup> $\pm$ 3,5
	C	76,0 <sup>a</sup> $\pm$ 3,3	42,1 <sup>a</sup> $\pm$ 2,5	90,0 <sup>def</sup> $\pm$ 3,8	51,4 <sup>d</sup> $\pm$ 3,1
8	A	73,5 <sup>ab</sup> $\pm$ 3,1	45,0 <sup>b</sup> $\pm$ 1,9	90,1 <sup>def</sup> $\pm$ 3,1	47,7 <sup>abde</sup> $\pm$ 1,9
	B	73,1 <sup>ab</sup> $\pm$ 5,8	43,7 <sup>ab</sup> $\pm$ 2,8	88,4 <sup>f</sup> $\pm$ 5,5	48,4 <sup>abde</sup> $\pm$ 3,4
	C	73,7 <sup>ab</sup> $\pm$ 3,4	43,0 <sup>ab</sup> $\pm$ 2,4	88,9 <sup>ef</sup> $\pm$ 3,9	49,5 <sup>be</sup> $\pm$ 2,9

Valores médios com letras diferentes representam diferenças significativas a  $p=0,05$  (Teste de Tukey).

## Anexo V

Tabela a7 - Valores médios ( $\pm$ DP) dos atributos CIELab ( $L^*$ , C,  $h^\circ$  e WI) da face interna (cortada) dos frutos minimamente processados, nos dias 0, 2 e 7 (Ensaio IV).

Dia	Id_am	$L^*_{int}$	$C_{int}$	$h^\circ_{int}$	$WI_{int}$
0	A	78,1 <sup>bc</sup> $\pm$ 2,5	14,2 <sup>d</sup> $\pm$ 1,6	100,1 <sup>a</sup> $\pm$ 2,1	73,8 <sup>c</sup> $\pm$ 2,5
	B	78,6 <sup>c</sup> $\pm$ 1,5	14,8 <sup>bcd</sup> $\pm$ 2,0	99,4 <sup>a</sup> $\pm$ 1,7	74,0 <sup>c</sup> $\pm$ 2,1
	C	78,4 <sup>c</sup> $\pm$ 2,0	14,4 <sup>cd</sup> $\pm$ 1,8	97,2 <sup>d</sup> $\pm$ 2,4	74,0 <sup>c</sup> $\pm$ 1,9
2	A	77,7 <sup>bc</sup> $\pm$ 1,7	16,7 <sup>a</sup> $\pm$ 2,1	96,0 <sup>d</sup> $\pm$ 1,7	72,2 <sup>ac</sup> $\pm$ 2,4
	B	74,5 <sup>a</sup> $\pm$ 2,3	16,4 <sup>ab</sup> $\pm$ 1,8	91,8 <sup>c</sup> $\pm$ 3,5	69,7 <sup>b</sup> $\pm$ 2,8
	C	75,8 <sup>a</sup> $\pm$ 3,6	16,0 <sup>abc</sup> $\pm$ 1,9	93,8 <sup>b</sup> $\pm$ 1,8	70,9 <sup>ab</sup> $\pm$ 3,6
7	A	78,0 <sup>bc</sup> $\pm$ 3,3	14,8 <sup>bcd</sup> $\pm$ 2,5	96,0 <sup>d</sup> $\pm$ 2,3	73,4 <sup>c</sup> $\pm$ 3,8
	B	78,6 <sup>c</sup> $\pm$ 1,4	14,6 <sup>cd</sup> $\pm$ 2,0	95,6 <sup>d</sup> $\pm$ 1,9	74,1 <sup>c</sup> $\pm$ 2,1
	C	76,3 <sup>ab</sup> $\pm$ 2,5	16,5 <sup>a</sup> $\pm$ 2,3	93,4 <sup>bc</sup> $\pm$ 2,0	71,1 <sup>ab</sup> $\pm$ 3,2

Valores médios com letras diferentes representam diferenças significativas a  $p=0,05$  (Teste de Tukey).

Tabela a8 - Valores médios ( $\pm$ DP) dos atributos CIELab ( $L^*$ , C,  $h^\circ$  e WI) da face externa (descascada) dos frutos minimamente processados, nos dias 0, 2 e 7 (Ensaio IV).

Dia	Id_am	$L^*_{ext}$	$C_{ext}$	$h^\circ_{ext}$	$WI_{ext}$
0	A	75,3 <sup>a</sup> $\pm$ 3,3	16,1 <sup>b</sup> $\pm$ 2,6	102,0 <sup>b</sup> $\pm$ 2,4	70,5 <sup>a</sup> $\pm$ 3,4
	B	75,9 <sup>a</sup> $\pm$ 2,2	17,0 <sup>b</sup> $\pm$ 2,1	100,2 <sup>b</sup> $\pm$ 1,8	70,5 <sup>a</sup> $\pm$ 2,2
	C	75,8 <sup>a</sup> $\pm$ 3,6	16,9 <sup>b</sup> $\pm$ 2,6	98,2 <sup>a</sup> $\pm$ 3,4	70,3 <sup>a</sup> $\pm$ 3,7
2	A	72,1 <sup>cd</sup> $\pm$ 2,4	23,8 <sup>a</sup> $\pm$ 3,3	91,5 <sup>b</sup> $\pm$ 2,9	63,3 <sup>bc</sup> $\pm$ 3,4
	B	70,2 <sup>cd</sup> $\pm$ 2,5	21,4 <sup>c</sup> $\pm$ 2,3	89,6 <sup>bc</sup> $\pm$ 2,1	63,3 <sup>bc</sup> $\pm$ 3,2
	C	70,4 <sup>bcd</sup> $\pm$ 2,5	21,8 <sup>c</sup> $\pm$ 1,9	89,5 <sup>bc</sup> $\pm$ 2,3	63,2 <sup>bc</sup> $\pm$ 2,8
7	A	72,3 <sup>d</sup> $\pm$ 3,5	20,8 <sup>c</sup> $\pm$ 2,2	91,2 <sup>bc</sup> $\pm$ 1,9	65,3 <sup>c</sup> $\pm$ 3,4
	B	73,0 <sup>bc</sup> $\pm$ 2,6	21,6 <sup>c</sup> $\pm$ 2,8	89,9 <sup>bcd</sup> $\pm$ 2,5	65,4 <sup>c</sup> $\pm$ 3,5
	C	70,0 <sup>b</sup> $\pm$ 3,1	23,8 <sup>a</sup> $\pm$ 2,5	88,7 <sup>c</sup> $\pm$ 2,0	61,7 <sup>bc</sup> $\pm$ 3,4

Valores médios com letras diferentes representam diferenças significativas a  $p=0,05$  (Teste de Tukey).

Dia	Amaros (A) Alcobaça	Baptista (B) Mafra	Quinta do Rol (C) Lourinhã
0			
2			
7			

Figura A4 – Registos fotográficos das amostras de pera ‘Rocha’ minimamente processada (Ensaio IV)